

**Posttranslationale Modifikation von  
Aldehydoxidasen und Xanthindehydrogenase:  
Isolierung und Charakterisierung der  
Molybdän-Cofaktor-Sulfurase ABA3  
aus *Arabidopsis thaliana***

**Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig**

**zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)**

**genehmigte  
D i s s e r t a t i o n**

**von Florian Bittner  
aus Wolfsburg**

<b>1. Referent:</b>	<b>Prof. Dr. Ralf-R. Mendel</b>
<b>2. Referent:</b>	<b>Prof. Dr. Rüdiger Cerff</b>
<b>eingereicht am:</b>	<b>24. Januar 2002</b>
<b>mündliche Prüfung am:</b>	<b>27. März 2002</b>

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

#### **Publikationen:**

Bittner, F., Oreb, M. and Mendel, R.R. (2001): ABA3 Is a Molybdenum Cofactor Sulfurase Required for Activation of Aldehyde Oxidase and Xanthine Dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276**: 40381-40384.

#### **Tagungsbeiträge:**

Bittner, F. & Mendel, R.R.: Analysis of Plant Molybdoenzymes. Posttranslational Modification of Monooxohydroxylases by Sulfuration. Gordon Research Conference "Molybdenum and Tungsten Enzymes", Oxford (1999)

Bittner, F. & Mendel, R.R.: Posttranslational Modification of Monooxohydroxylases by Sulfuration. SFB Congress "Metal Mediated Reactions Modelled after Nature", Jena (1999)

Bittner, F. & Mendel, R.R.: ABA3 is a NifS-like Sulfotransferase for Activation of Aldehyde Oxidase and Xanthine Dehydrogenase and Participates in the Last Step of ABA-Biosynthesis. Botanikertagung, Jena (2000)

Bittner, F., Schwarz, G. und Mendel, R.R.: ABA3 ist eine Sulfotransferase und limitiert den letzten Schritt der ABA-Biosynthese. 13. Tagung der Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen (2000)

Bittner, F., Oreb, M. and Mendel, R.R.: Isolation and Characterization of *Arabidopsis* Molybdenum Cofactor Sulfurase ABA3 - The last Step of Moco-Maturation for Aldehyde Oxidases and Xanthine Dehydrogenase. Gordon Research Conference "Molybdenum and Tungsten Enzymes", Oxford (2001)

## Abkürzungen

A	Adenin
aa	Aminosäuren
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
AO	Aldehydoxidase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytidin
Ci	Curie
cDNA	komplementäre DNA
CN <sup>-</sup>	Cyanid
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nucleosidtriphosphat
dTTP	desoxy-Tymintriphosphat
DNase	Desoxyribonuclease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
G	Guanosin
h	Stunde
IES	Indolessigsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
M	Mol (Konzentration)
max.	maximal
min	Minute
mind.	mindestens
mM	Millimolar
Mo	Molybdän
Moco	Molybdäncofaktor
MPT	Molybdopterin
mRNA	“messenger“-RNA
NADH	Nicotinamid-adenindinucleotid (reduziert)
nm	Nano-Meter
NR	Nitratreduktase
OD	optische Dichte
PA	Polyacrylamid

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Picomol (Stoffmenge)
PMS	Phenazinmethosulfat
PVDF	Polyvinylidon-Difluorid
rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuclease
upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SO	Sulfitoxidase
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	“unit“, Einheit der Enzymaktivität
UE	Untereinheit
ÜN	Übernachtskultur
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v:v	Volumen zu Volumen-Verhältnis
Vol.	Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
XDH	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase

### *Arabidopsis*-Ökotypen

Col-O	Columbia
Le	Landsberg erecta
Ws	Wassilewskija

### Abkürzungen für Artennamen

<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. vinelandii</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>L. esculentum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>N. plumbaginifolia</i>	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Die biologische Bedeutung des Spurenelementes Molybdän	1
1.2.	Die Entdeckung des Molybdän-Cofaktors	2
1.3.	Die Struktur des Molybdän-Cofaktors	3
1.4.	Die Synthese des Molybdän-Cofaktors	5
1.5.	Der terminale Schwefel der Monooxo-Mo-Hydroxylasen	7
1.6.	Die Molybdän-Cofaktor-Sulfurase ABA3 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
<b>2.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>14</b>
2.1.	Charakterisierung der <i>Arabidopsis</i> -Mutanten <i>aba3.1</i> , <i>aba3.2</i> und <i>13.5</i>	14
2.1.1.	Physiologische und biochemische Charakterisierung der Mutanten	15
2.1.2.	Molekulare Charakterisierung der T-DNA Insertion in der Mutante <i>13.5</i>	19
2.2.	Isolierung und Charakterisierung des <i>aba3</i> -Gens	22
2.2.1.	Design von degenerierten Primern anhand von Sequenzen bekannter putativer Moco-Sulfurasen anderer Organismen.	22
2.2.2.	Isolierung von <i>aba3</i> -cDNAs mittels RT-PCR	25
2.2.2.1.	Sequenzierung und Analyse des isolierten cDNA-Fragmentes	26
2.2.2.2.	Spleiß-Variationen der <i>aba3</i> -cDNA	31
2.2.3.	Genomische Charakterisierung von <i>aba3</i>	32
2.2.3.1.	Lokalisierung von <i>aba3</i>	33
2.2.3.2.	Southern-Analyse des <i>aba3</i> -Gens aus <i>Arabidopsis</i>	34
2.2.3.3.	Analyse des genomischen 5'-Bereiches von <i>aba3</i> auf Promotor-Elemente	34
2.2.3.4.	Genomische Umgebung von <i>aba3</i>	36
2.2.3.5.	Repetition von Bereichen des <i>aba3</i> -Gens	37
2.2.4.	Molekulare Analyse der Mutanten <i>aba3.1</i> , <i>aba3.2</i> und <i>13.5</i>	38
2.3.	Funktionelle Komplementation der <i>Arabidopsis</i> -Mutanten <i>aba3.1</i> und <i>aba3.2</i>	41
2.4.	Biochemische Charakterisierung des ABA3-Proteins	44
2.4.1.	Analyse der Primärsequenz der putativen Moco-Sulfurase ABA3 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
2.4.1.1.	Struktur und Signaturen des ABA3-Proteins	47
2.4.2.	Expression und Aufreinigung von ABA3	50
2.4.2.1.	Herstellung der Expressionskonstrukte	50
2.4.2.2.	Überexpression von ABA3 in <i>E. coli</i>	51

2.4.2.3.	Affinitätschromatographische Aufreinigung von ABA3	52
2.4.2.4.	Aufreinigung von ABA3 mittels Anionenaustauscher-Chromatographie	53
2.4.2.5.	Aufreinigung von ABA3 mittels Gelfiltration	54
2.4.2.6.	Bestimmung des Absorptionsspektrums von ABA3	56
2.4.3.	Nachweis der Cystein-Desulfurase-Aktivität von ABA3	57
2.4.3.1.	„L-Alanin-Assay“ zur Bestimmung der Cystein-Desulfurase-Aktivität von rekombinantem ABA3	58
2.4.3.2.	Inhibierung von ABA3 durch Behandlung mit alkylierenden Agenzien	61
2.4.4.	Entwicklung eines definierten <i>in vitro</i> -Systems zur Sulfurierung pflanzlicher Aldehydoxidasen durch ABA3	62
2.4.4.1.	Überexpression der Aldehydoxidase AAO1 aus <i>Arabidopsis</i> in <i>Pichia pastoris</i>	63
2.4.4.2.	Bestimmung der Moco-Sulfurase-Aktivität von ABA3 durch <i>in vitro</i> -Sulfurierung von rekombinanter AO	64
2.5.	Untersuchungen zur Regulation von <i>aba3</i>	67
2.5.1.	Untersuchung der Transkription von <i>aba3</i> unter Standard-Kulturbedingungen	67
2.5.2.	Abhängigkeit der <i>aba3</i> -Expression von verschiedenen Stressen	68
2.6.	Gezielte Mutagenese von ABA3	70
2.7	Untersuchung zur Kernlokalisierung von ABA3	72
<b>3.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
3.1.	Die pflanzliche Moco-Sulfurase ABA3 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
3.1.1.	Vergleich von ABA3 mit anderen pflanzlichen Moco-Sulfurasen	76
3.1.2.	Die genomische Umgebung von <i>aba3</i>	79
3.2.	Charakterisierung der <i>Arabidopsis aba3</i> -Mutanten	82
3.2.1.	Die Mutanten <i>aba3.1</i> , <i>aba3.2</i> und <i>13.5</i> sind allel	82
3.2.2.	Die Mutationen der einzelnen <i>aba3</i> -Mutanten manifestieren sich phänotypisch mit unterschiedlicher Stärke	83
3.2.2.1.	Welche Rolle spielt die T-DNA Integration in der Mutante <i>13.5</i> ?	87
3.3.	Die Funktionen des ABA3-Proteins	88
3.3.1.	Bewertung der Überexpression von ABA3 in <i>E. coli</i>	89
3.3.2.	ABA3 rekrutiert den zu übertragenden Schwefel über seine Cystein-Desulfurase-Aktivität	90
3.3.3.	Die ABA3-vermittelte Moco-Sulfurierung von AO und XDH	92
3.4.	ABA3 unterliegt der Regulation durch diverse Stresse und wirkt seinerseits regulierend auf andere Proteine	96
3.4.1.	Die physiologische Bedeutung der Moco-Sulfurase für die Pflanze	99

<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>102</b>
4.1.	Laborstandards	102
4.1.1.	Verwendete Materialien und Chemikalien	102
4.1.2.	Verwendete Organismen-Stämme	102
4.1.3.	Verwendete Plasmide	102
4.2.	Molekularbiologische Standardmethoden	103
4.2.1.	Klonierungstechniken	103
4.2.2.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	103
4.2.2.1.	PCR-Mutagenese	104
4.2.2.2.	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	104
4.2.2.3.	Fusions-PCR	105
4.2.2.4.	Inverse PCR	106
4.2.2.5.	Analytische PCR	106
4.2.3.	Nachweis von Nukleinsäuren	107
4.2.3.1.	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	107
4.2.3.2.	Markierung von DNA-Fragmenten mit Fluorescein-11-dUTP	107
4.2.3.3.	Southern-Blot Analyse	107
4.2.3.4.	Northern-Blot Analyse	107
4.2.3.5.	DNA-Sequenzierung	108
4.3.	Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i>	108
4.3.1.	Pflanzenanzucht	108
4.3.2.	DNA-Isolation aus <i>Arabidopsis</i> (modifiziert nach Murray & Thompson, 1980)	109
4.3.3.	Gesamt-RNA aus <i>Arabidopsis</i> (nach Logemann <i>et al.</i> , 1987)	110
4.3.4.	<i>In planta</i> -Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> durch Vakuum-infiltration (modifiziert nach Bechthold <i>et al.</i> , 1993)	111
4.3.4.1.	Vorbereitung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	111
4.3.4.2.	Kontrolle der Transformation von Agrobakterien	111
4.3.4.3.	Vorbereitung der Pflanzen	112
4.3.4.4.	Vakuuminfiltration	112
4.3.4.5.	Ernten von <i>Arabidopsis</i> -Samen	114
4.3.4.6.	Sterilisation von <i>Arabidopsis</i> -Samen	114
4.3.4.7.	Selektion transgener Pflanzen	115
4.3.4.8.	Überprüfung transgener Pflanzen auf Fremdgenintegration	116
4.3.5.	Nachweis von Enzymaktivitäten in <i>Arabidopsis</i>	116
4.3.5.1.	Bestimmung der Nitratreduktase-Aktivität	116
4.3.5.2.	Nachweis der Aktivitäten von Aldehydoxidasen und Xanthindehydrogenase	117

---

	(modifiziert nach Koshiba <i>et al.</i> , 1996)	
4.4.	Proteinbiochemische Arbeiten	118
4.4.1.	Biochemische Standardmethoden	118
4.4.1.1.	Überexpression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	118
4.4.1.2.	Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-getaggten Proteinen	119
4.4.1.3.	Anionentauscher-Chromatographie	119
4.4.1.4.	Gelfiltration	120
4.4.1.5.	Konzentrierung von Proteinlösungen	120
4.4.1.6.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	120
4.4.1.7.	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	121
4.4.1.8.	Immunblot-Analyse	121
4.4.2.	Spezielle Methoden	122
4.4.2.1	Expressionssystem <i>Pichia pastoris</i>	122
4.4.2.2.	Überexpression der Aldehydoxidase AO aus <i>Arabidopsis</i> in <i>Pichia pastoris</i>	123
4.4.2.3.	Extraktion von Proteinen aus <i>Pichia pastoris</i>	124
4.4.2.4.	Enzymatischer Nachweis von L-Alanin	125
4.4.2.5.	Inhibierung von ABA3 durch Alkylierung mit N-Ethylmaleimid	126
4.5.	Erzeugung von transient transgenen Pflanzen mittels Partikel-Kanone	127
	zur Untersuchung der Kern-Lokalisierung von ABA3	
4.5.1.	Vorbereitung des Pflanzenmaterials und Coating der Goldpartikel mit DANN	127
4.5.2.	Transformation des Pflanzenmaterials	128
4.5.3.	Analyse des transient transformierten Pflanzenmaterials	128

## 5. Literaturverzeichnis



# 1. Einleitung

## 1.1. Die biologische Bedeutung des Spurenelementes Molybdän

Obwohl die Relevanz des Spurenelementes Molybdän (Mo) für das Wachstum von Pflanzen und Mikroorganismen schon seit Beginn dieses Jahrhunderts bekannt ist (zusammengefaßt durch Coughlan, 1980), blieb die Natur der biologisch aktiven Form des Molybdäns lange Zeit unerforscht. Mo-Mangelerscheinungen von Nutzpflanzen wurden schon vor weit über 50 Jahren beschrieben (zusammengefaßt durch Gupta, 1997) und konnten auf einen Verlust der Nitratreduktase (NR)-Aktivität zurückgeführt werden. Die NR katalysiert die Schlüsselreaktion der anorganischen Stickstoff-Assimilation und ist hierdurch für Pflanzen essentiell. In ihrem aktiven Zentrum enthalten sowohl eukaryontische als auch prokaryontische NRs das katalytische Metall Mo. Als weitere Mo-Enzyme in höheren Pflanzen konnten darüberhinaus auch die im Purin-Katabolismus involvierte Xanthindehydrogenase (XDH), die in einigen Leguminosen Allantoinensäure als Transportform für Stickstoff synthetisiert (zusammengefaßt durch Nguyen, 1986), und Aldehydoxidasen (AO) identifiziert werden. Für letzere wurde eine wichtige Bedeutung in der Phytohormon-Biosynthese nachgewiesen, indem gezeigt werden konnte, daß sie jeweils den letzten Schritt der Synthese von Indolylessigsäure (Koshiba *et al.*, 1996) und Abscisinsäure (Walker-Simmons *et al.*, 1989; Taylor, 1991; Seo *et al.*, 2000a) katalysieren. Erst kürzlich wurde als viertes Mo-Enzym in Pflanzen eine Sulfitoxidase (SO) gefunden (Eilers *et al.*, 2001), deren Bedeutung in tierischen Organismen zwar klar, in Pflanzen jedoch offen ist.

Die Bedeutung von Mo für Menschen und Tiere wurde erstmals durch den Nachweis der Bindung von Mo an die Xanthinoxidase in Leber und Magen von Ratten gezeigt (Reichert & Westerfeld, 1953). Dies galt gleichzeitig als erster Hinweis auf die Assoziation von Mo mit einem Enzym. Wenig später wurde dann auch die Mo-Abhängigkeit der tierischen Aldehydoxidase (Mahler *et al.*, 1954) gezeigt, was im selben Jahr auch für die Nitratreduktase des Ascomyceten *Neurospora crassa* (Nicholas *et al.*, 1954; Nicholas & Nason, 1954) gelang, bevor schließlich durch Cohen *et al.* (1971) auch die humane Sulfitoxidase als Molybdoenzym beschrieben wurde. Bis heute wurde eine Vielzahl weiterer Enzyme, die das Metall Mo in gebundener Form für die Katalyse verschiedenster Oxidations- und Reduktionsreaktionen benötigen, in allen Organismenreichen gefunden. Der Großteil dieser ca. 40 Enzyme, die in verschiedene Familien unterteilt werden (Hille, 1996a; Hille, 1996b; Kisker *et al.*, 1997), ist

dabei prokaryontischen Ursprunges, eine vergleichsweise geringe Anzahl ist hingegen unter den Eukaryonten vertreten.

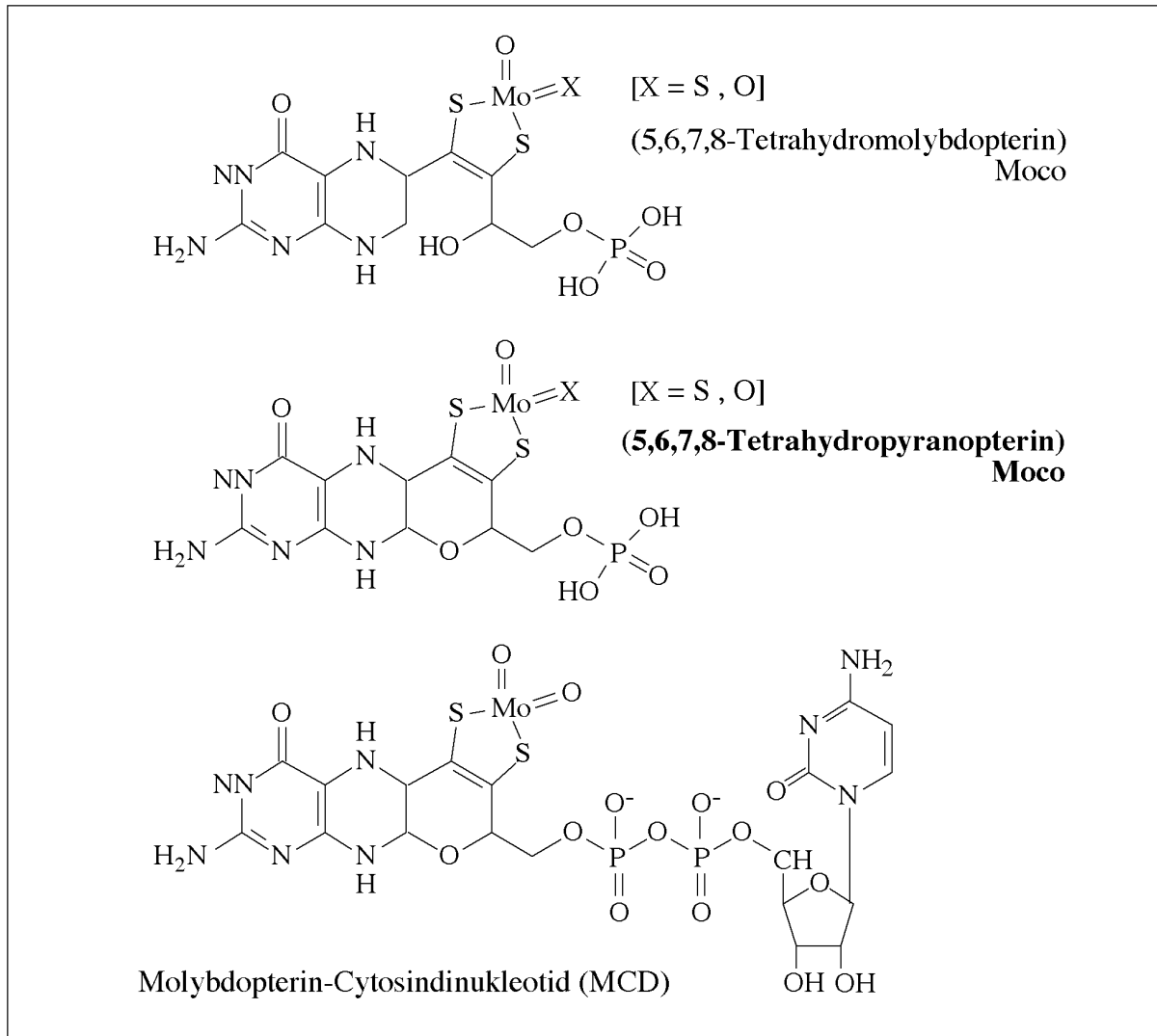
## 1.2. Die Entdeckung des Molybdän-Cofaktors

Mit der genetischen Analyse des filamentösen Pilzes *Aspergillus nidulans* (heute: *Emericella nidulans*) wurde der Grundstein zur Untersuchung des Mo-Metabolismus gelegt. Cove und Pateman (1963) isolierten 6 NR-Mutanten, von denen 5 neben dem Verlust der NR-Aktivität auch einen simultanen Verlust der ebenfalls Mo-abhängigen XDH-Aktivität zeigten. Da Mo die einzige Gemeinsamkeit dieser ansonsten so unterschiedliche Reaktionen katalysierenden Enzyme zu sein schien, wurde von Pateman *et al.* (1964) auf einen gemeinsamen Molybdän-Cofaktor (Moco) geschlossen, dessen Synthese in den entsprechenden NR/XDH-Mutanten defizient ist. Die an der Synthese des Cofaktors beteiligten Genloci wurden demnach mit der Bezeichnung "*cnx*" für "cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase" versehen. Diese Namensgebung wurde später auch für Pflanzen beibehalten, wohingegen für die entsprechenden bakteriellen Loci die Operon-Bezeichnungen "*moa*, *mob*, *mod*, *moe* und *mog*" sowie für Säuger die Bezeichnung "*mocs*" (molybdenum cofactor synthesis) eingeführt wurden. Daß der Moco nicht nur innerhalb der Molybdoenzyme eines Organismus, sondern auch innerhalb der Molybdoenzyme verschiedener Organismen austauschbar ist, konnte von Nason *et al.* (1971) gezeigt werden. Sie komplementierten inaktives NR-Apoenzym der *Neurospora crassa nit-1* Mutante durch Zugabe Moco-haltiger Fraktionen tierischen, pflanzlichen sowie bakteriellen Ursprungs zu funktionell aktiver NR. Hierdurch war ein bedeutender Hinweis auf die universelle Struktur, die ubiquitäre Verbreitung und die konservierte Funktion des Mocos gegeben. Lediglich die Nitrogenase war als einziges unter den Mo-haltigen Enzymen nicht zur Komplementation der *nit1*-Mutante in der Lage, woraufhin auf eine andersartige Struktur der Mo-haltigen Komponente des Enzyms geschlossen wurde (Pienkos *et al.*, 1977). Wie kurz darauf gezeigt werden konnte, wird das Mo der Nitrogenase in bisher einzigartiger Weise über Homocitrat im sogenannten Fe-Moco komplexiert (Shah & Brill, 1977).

### 1.3. Die Struktur des Molybdän-Cofaktors

Entsprechend der ausgesprochen labilen Natur des Mocos und seiner extremen Sensitivität gegenüber Sauerstoff mußte ein Großteil der Strukturanalyse des Mocos an dessen Degradations- und Oxidationsprodukten durchgeführt werden. Zunächst konnte so durch Charakterisierung des Mocos aus Xanthinoxidase (XO), SO und NR ein Pterin als strukturelle organische Komponente des Mocos identifiziert werden (Johnson *et al.*, 1980). Mit Hilfe der beiden Moco-Oxidationsprodukte FormA und FormB wurde wenig später auch die Präsenz einer vier C-Atome umfassenden Seitenkette mit einem terminalen Phosphatester am C6-Atom der Pterin-Komponente festgestellt (Johnson *et al.*, 1984). Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen FormB und dem natürlichen Metaboliten Urothion ließen Johnson *et al.* (1982) ferner auch auf die Gegenwart von Schwefel-Gruppen im Moco schließen, was durch die Sensitivität des Mocos gegenüber Sulfhydrylreagenzien sowie durch seine Stabilisierung in Gegenwart von reduzierenden Agenzien untermauert wurde (Alikulov & Mendel, 1984). Tatsächlich zeigte die strukturelle Charakterisierung des Cofaktors nach Behandlung mit thiol-spezifisch alkylierendem Iodoacetamid die Präsenz zweier Thiole am C1- und C2-Atom der Seitenkette auf, die zusammen eine Dithiolengruppe ausbilden (Kramer *et al.*, 1987). Ein auf der Basis all dieser Daten erstelltes Modell der Struktur des aktiven Moco schlug die Assemblierung des Mo-Atoms an eine bizyklische 5,6,7,8-Tetrahydropterin-Komponente über die Dithiolengruppe sowie die Bindung zweier weiterer Liganden an das Mo-Atom vor (Kramer *et al.*, 1987). Seither wird die Mo-enthaltende, aktive Form des Molybdän-Cofaktors als Moco, die Mo-freie, inaktive Form hingegen als Molybdopterin (MPT) bezeichnet. Jedoch konnte erst 1995 mit der ersten Kristallisierung eines Molybdoenzym, der Aldehydoxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas*, durch Romao *et al.* die Richtigkeit dieses Moco-Struktur-Modells überprüft werden. Mit einer einzigen Abweichung, nämlich der Ausbildung eines Pyranoringes zwischen dem C3-Atom der Seitenkette und dem C7-Atom des Pterins zu einem trizyklischen Ringsystem, war die bis dahin angenommene Struktur korrekt abgeleitet worden (Abb. 1.1). Das Vorliegen des nativen Mocos als 5,6,7,8-Tetrahydropyranopterin wurde später durch die Aufklärung der Strukturen weiterer bakterieller Molybdoenzyme bestätigt (Schindelin *et al.*, 1996; Boyington *et al.*, 1997). Basierend auf den Erkenntnissen, daß die *nit-1*-Mutante aus *Neurospora crassa* sowohl durch prokaryontischen als auch durch eukaryontischen Moco komplementiert werden kann, wurde diese Struktur als unter allen Organismen konserviert vorgeschlagen. Wie jedoch gezeigt werden konnte, assoziiert der Moco eubakterieller Molybdoenzyme ein Nukleotid über eine

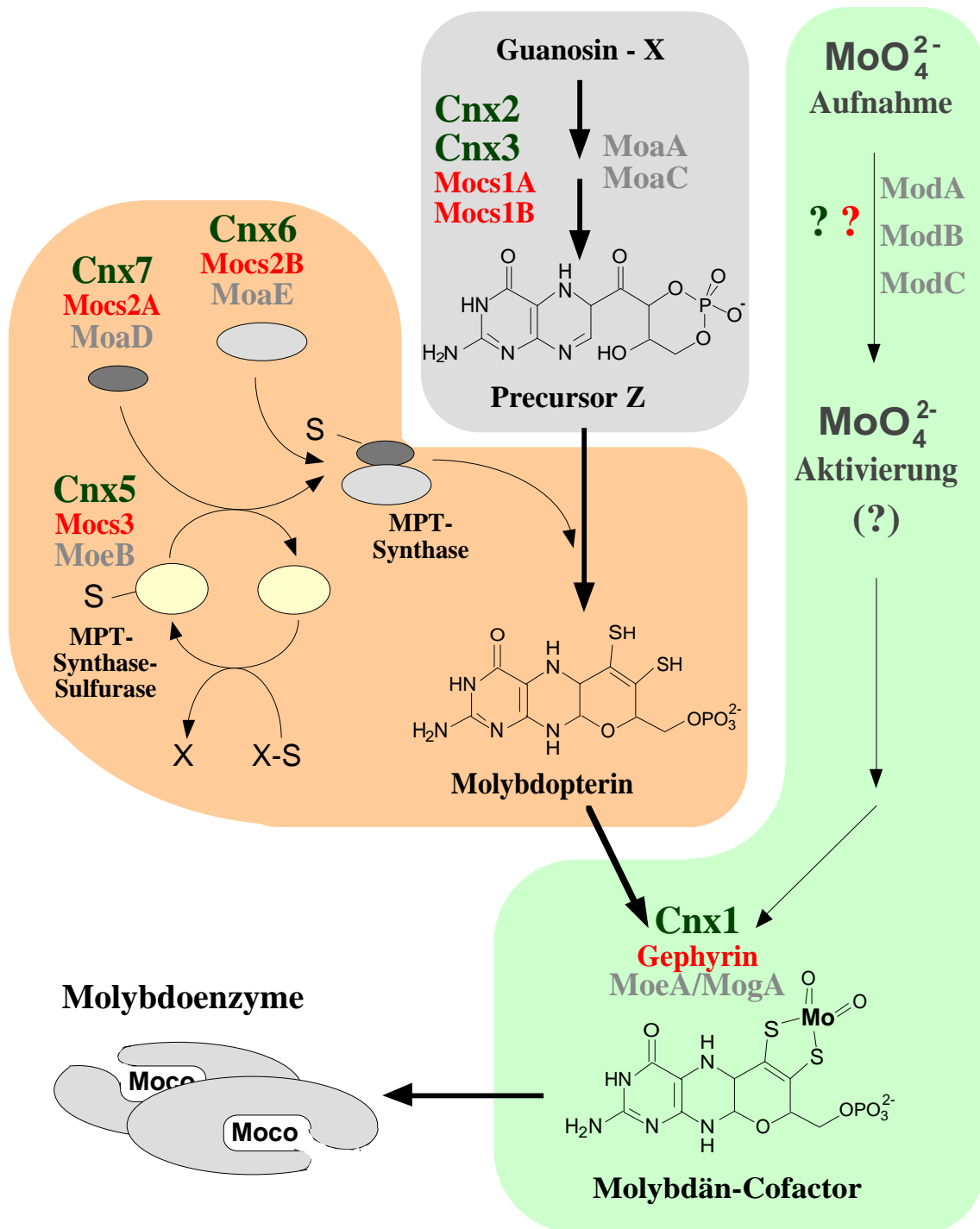
Pyrophosphatbindung an das C4-Atom der Seitenkette des MPTs (Johnson *et al.*, 1990) und weicht insofern von der Struktur des eukaryontischen Mocos ab. Da diese Variationen jedoch nicht die Grundstruktur des Mocos in Frage stellen, kann weiterhin von einer unter allen Organismen konservierten Struktur des Mocos ausgegangen werden.



**Abb. 1.1: Struktur des Molybdän-Cofaktors in Pro- und Eukaryonten.** Neben der von Kramer *et al.* (1987) vorgeschlagenen Struktur des 5,6,7,8-Tetrahydromolybdopterins (oben) sind die mittlerweile durch Kristallisierung bestätigten Strukturen des eukaryontischen aktiven 5,6,7,8-Tetrahydropyranopterins (Mitte) und des prokaryontischen Molybdopterin-Cytosindinukleotids (MCD) dargestellt.

## 1.4 Die Synthese des Molybdän-Cofaktors

Parallel zur Aufklärung der Struktur des Mococofaktors ergaben sich durch die Charakterisierung der 5 pleiotropen *cnx*-Mutanten aus *Aspergillus nidulans* (Pateman *et al.*, 1964) erste Hinweise auf die Beteiligung mehrerer verschiedener Genprodukte an der Biosynthese des Mococofaktors. Von entscheidender Bedeutung für die Aufklärung des Mococofaktor-Synthese-Weges waren jedoch die Arbeiten an entsprechenden *E. coli*-Mutanten. Rajagopalan *et al.* (1992) zeigten zusammenfassend, daß mehr als 15 Gene auf den 5 Mo-Operonen an der Synthese des Mococofaktors in *E. coli* beteiligt sind. Demnach wird in einem ersten, bislang aber wenig untersuchten Schritt, ein Guanosin-Derivat durch Ringerweiterung von den Proteinen MoaA und MoaC zu einer Schwefel-freien Pterinverbindung, dem "Precursor Z", umgesetzt (Abb. 1.2). Mit Hilfe von radioaktiv markiertem GTP konnte gezeigt werden, daß alle markierten C-Atome in den "Precursor Z", der bislang als erstes nachweisbares Zwischenprodukt der Mococofaktor-Synthese gilt, inkorporiert werden (Wuebbens & Rajagopalan, 1995). In einem zweiten Schritt wird von einer MPT-Synthase die Umsetzung des "Precursor Z" zu MPT katalysiert, indem es zur Ausbildung der Dithiolengruppierung durch Einfügen der beiden SH-Gruppen und zur Dezyklisierung der Phosphatgruppe kommt (Pitterle & Rajagopalan, 1993; Pitterle *et al.*, 1993). Die MPT-Synthase selbst ist ein Heterotetramer und besteht aus zwei kleinen (MoaD) und zwei großen Untereinheiten (MoaE). Um aktiv zu sein und Schwefel auf den "Precursor Z" übertragen zu können, muß die kleine Untereinheit zunächst ihrerseits sulfuriert werden. Dies geschieht durch die Sulfotransferase MoeB (MPT-Synthase-Sulfurase), die den Schwefel aus einer bislang unbekannten Quelle bezieht. Da *E. coli* *mogA*-Mutanten durch Zugabe hoher Konzentrationen von Molybdat partiell reparierbar sind, wurde angenommen, daß in dem letzten Schritt der Mococofaktor-Synthese die Inkorporation von Mo in das MPT-Gerüst durch das MogA-Protein katalysiert wird (Hinton & Dean, 1990; Rajagopalan, 1996; Joshi *et al.*, 1996). Die für *E. coli* und andere Eubakterien spezifische Anheftung eines Nukleotids zur Herstellung der aktiven Dinukleotid-Form des Cofaktors (MGD) wird durch das Protein MobA katalysiert (Palmer *et al.*, 1994 und 1996), dessen Aktivität durch die Gegenwart von MobB gesteigert wird (Heck *et al.*, 1997). Für die Aufnahme des Molybdates aus der Umgebung ist in *E. coli* der hochaffine Mo-Transporter des *mod*-Operons verantwortlich (Rech *et al.*, 1995). Einige weitere Mococofaktor-Syntheseloci wie *moeA* und *moaB* sind zwar bekannt, ihnen konnte aber bisher keine präzise Funktion zugeordnet werden.



**Abb. 1.2: Modell der Moco-Biosynthese in Eukaryonten nach Mendel & Schwarz (2002).** Basierend auf der Charakterisierung der bakteriellen Moco-Synthese-Proteine (Rajagopalan, 1996) beinhaltet das Modell die entsprechenden homologen und funktionell charakterisierten eukaryontischen Proteine aus *Arabidopsis thaliana* (Cnx-Nomenklatur) und *Homo sapiens* (Mocs-Nomenklatur). Die entsprechenden *E. coli*-Proteine sind in der Mo-Nomenklatur angegeben.

Basierend auf der hochkonservierten Struktur und der universellen Funktion des Mococyclins wurde angenommen, daß auch die Synthese des Mococyclins in allen Organismen zumindest ähnlich abläuft (Mendel, 1992). Hinweise hierzu konnten durch die Charakterisierung verschiedener eukaryontischer Moco-Mutanten erhalten werden (zusammengefaßt durch Müller & Mendel, 1989; Mendel, 1997). Die über funktionelle Komplementation der *E. coli*-Mutanten *mogA* bzw. *moaA* und *moaC* isolierten ersten pflanzlichen Moco-Gene *cnx1* (Stallmeyer *et al.*, 1995) bzw. *cnx2* und *cnx3* (Hoff *et al.*, 1995) aus *Arabidopsis thaliana* erbrachten schließlich den Beweis zu dieser Hypothese. So konnten für das 2-Domänen-Protein Cnx1 signifikante Homologien zu den bakteriellen Moco-Synthese-Proteinen MogA und MoeA gefunden werden, wohingegen Cnx2 und Cnx3 Homologien zu MoaA und MoaC aufweisen. Über den Vergleich von Aminosäuresequenzen wurden später auch ESTs ("Expressed Sequence Tags") der Moco-Gene *cnx5* und *cnx6*, deren Proteine jeweils homolog zu MoeB bzw. MoaE aus *E. coli* sind, gefunden (Nieder *et al.*, 1997). Mit Hilfe eines Nachweises von Protein-Protein-Interaktionen wurde zuletzt auch das zur kleinen Untereinheit der MPT-Synthase MoaD aus *E. coli* homologe Cnx7 aus *Arabidopsis thaliana* isoliert (Mendel & Schwarz, 2002). Auf der Grundlage dieser Daten und in Anlehnung an die bakterielle Moco-Synthese wurde bereits 1997 durch Mendel ein Modell für die eukaryontische Moco-Synthese erstellt. Unter Verwendung von Daten aus humanen und anderen eukaryontischen sowie prokaryontischen Systemen, die die Strukturauflösung einzelner Proteine und die Analyse weiterer Metaboliten einschließen, wurde dieses Modell noch einmal verfeinert (Mendel & Schwarz, 2002). Es kann daher als das bisher vollständigste und detaillierteste Modell der Moco-Biosynthese angesehen werden.

## 1.5 Der terminale Schwefel der Monooxo-Mo-Hydroxylasen

Bereits 10 Jahre vor der Beschreibung des Mococyclins durch Johnson *et al.* (1980) wurde gezeigt, daß die Molybdoenzyme XO aus Kuhmilch sowie XDH und AO aus Hühnchen-Leber durch Behandlung mit Cyanid ( $\text{CN}^-$ ) inaktiviert werden können (Massey & Edmondson, 1970). Während dieser Prozedur wird von den Proteinen ein Schwefel-Atom entfernt, welches in Form von Thiocyanat ( $\text{SCN}^-$ ) gebunden wird und sogar quantitativ nachgewiesen werden kann. Erst nachdem der Moco als Pterin- und Mo-haltiger Cofaktor charakterisiert war, konnte auch eine Sub-Klassifizierung der entsprechenden Molybdoenzyme erfolgen. Schon bald zeigte sich, daß nicht alle Molybdoenzyme in gleicher Weise auf die Behandlung mit  $\text{CN}^-$  reagieren. So stellte

Coughlan (1980) fest, daß die SO aus der Hühnchen-Leber, anders als XDH/XO und AO, nicht durch  $\text{CN}^-$  inaktivierbar ist. Er schloss daraus, daß der sogenannte cyanolysierbare Schwefel entweder in Form eines Persulfids oder Cysteins an XDH/XO und AO, nicht jedoch an die SO, gebunden sein müßte. Als weitere Möglichkeit gab er an, daß der Moco in XDH/XO und AO einen Schwefel-Liganden enthält, der im Moco der SO nicht präsent ist. Nur wenig später konnten Wahl & Rajagopalan (1982) beweisen, daß der cyanolysierbare Schwefel weder den jeweiligen Apoproteinen noch der Pterin-Komponente des Mocos entstammt, sondern anorganischer Natur sein muß. Sie zeigten, daß die zuvor durch  $\text{CN}^-$ -Behandlung inaktivierten Enzyme XDH/XO und AO durch Behandlung mit Sulfid und Dithionit wieder vollständig aktiviert werden können. Zum Nachweis der anorganischen Natur des Schwefels liessen sie auf diese Weise radioaktiv markierten [ $^{35}\text{S}$ ] in die Desulfo-XDH einbauen und demonstrierten, daß der markierte Schwefel des nun aktiven Enzyms sowohl durch Behandlung mit SDS als auch durch Guanidiniumchlorid wieder entfernt werden kann. Als Hauptkriterium für eine nicht-kovalente Assoziation des Schwefels führten sie jedoch die spezifische Bildung eines [ $^{35}\text{S}$ ]Methylenblau-Komplexes durch Herauslösen des "säure-labilen" Schwefels aus der markierten XDH an. Basierend auf diesen Ergebnissen postulierten sie die Ligandierung des cyanolysierbaren Schwefels an das Mo-Atom des Mocos und keinesfalls an das Pterin oder das Apoprotein. Für diese Hypothese sprachen ferner die Daten von Bordas *et al.* (1980), denen erstaunlicherweise nur wenig Bedeutung beigemessen wurde. Durch EXASF-Analyse (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) der immer in einem Pool aus aktivem und inaktivem Enzym vorliegenden XO aus Kuhmilch wiesen sie nach, daß das Mo der aktiven XO durch ein terminales Sulfid, eine terminale Oxo-Gruppe und zwei Cysteine ligandiert ist. In der Desulfo-XO, der inaktiven Form des Enzyms, hingegen ersetzt ein zweiter terminaler Oxo-Ligand den terminalen Sulfido-Liganden. Auf welche Weise und zu welchem Zeitpunkt der terminale Schwefel angefügt wird, blieb jedoch unklar.

Erst mit der Charakterisierung der *maroon-like* (*ma-l*) Mutanten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ergaben sich Hinweise auf einen enzymatischen Ursprung der Assoziation des terminalen Schwefels an den Moco. Die kastanienbraune Augenfarbe der Fliegen, die aus der Reduktion des roten Augenpigments Drosopterin resultiert und auf das Fehlen jeder XDH-Aktivität zurückzuführen ist, war hier namensgebend für diese rezessive Mutation. Weitere äußerliche Merkmale der *ma-l* Mutanten sind verkürzte, aufgeblähte und unregelmäßig geformte Malpighi-Gefäße, die gelb-orangene Pteridin-Globuli enthalten (Schwinck, 1960). Biochemisch zeichnen sich die Mutanten durch das Fehlen der Aktivitäten von AO (Courtright, 1967), XDH



(Forrest *et al.*, 1956; Glassman & Mitchell, 1959) und der bisher nur für *Drosophila* beschriebenen Pyridoxaloxidase (PO; Forrest *et al.*, 1961) aus. Alle drei Enzyme gehören in die Molybdoenzym-Klasse der Monooxo-Mo-Hydroxylasen, die allesamt den terminalen Schwefel für ihre Aktivität benötigen. Das vierte in *Drosophila* vorkommende Molybdoenzym, die SO, ist in der *ma-l* Mutante nicht betroffen (Bogart & Bernini, 1981). Sie gehört interessanterweise in die Klasse der Dioxo-Mo-Enzyme und benötigt daher den terminalen Schwefel nicht für ihre Aktivität. Wie Warner & Finnerty (1981) durch den *nit-1*-Rekonstitutions-Assay zeigen konnten, enthalten *ma-l* Fliegen normale Mengen des Mococofaktors, wodurch bewiesen war, daß die Mococofaktor-Biosynthese in den Mutanten nicht beeinträchtigt ist. Vielmehr schien im Falle der *ma-l* Fliegen eine posttranslationale Modifikation des Mococofaktors, die PO, XDH und AO gemein ist, unterbunden zu sein. Durch Wiederherstellung der Aktivitäten der inaktiven PO, XDH und AO in *ma-l* Rohextrakten nach Behandlung mit Sulfid und Dithionit konnten Wahl *et al.* (1982) zeigen, daß die *ma-l* Mutation die Inkorporation des terminalen Schwefels unterbindet bzw. daß die Aktivierung von Monooxo-Mo-Hydroxylasen genetisch kontrolliert ist.

Ähnliche Eigenschaften wie die *ma-l* Mutante aus *Drosophila* weist auch die *hxB*-Mutante (hypoxanthine non-utilizer, gene B) aus *Aspergillus nidulans* auf. Die Unfähigkeit von *hxB*-Stämmen auf Hypoxanthin oder Nicotinat als alleiniger Stickstoff-Quelle zu wachsen, ist die Manifestierung des Verlustes der Aktivitäten von XDH und Nicotinahydroxylase (NH, Scazzocchio, 1973; Scazzocchio *et al.*, 1973; Lewis *et al.*, 1978). Die NR als drittes Molybdoenzym in *Aspergillus*, und wie die SO den Dioxo-Mo-Enzymen zugehörig, ist in der *hxB*-Mutante hingegen nicht betroffen. Auch in der *hxB*-Mutante sind demnach nur die den terminalen Schwefel benötigenden Molybdoenzyme durch die Mutation beeinträchtigt, nicht jedoch die NR mit einem Dioxo-Mo-Zentrum. Sowohl für den *hxB*-Locus als auch für den *ma-l*-Locus kann demnach eine Beteiligung an der enzymatischen Inkorporation des terminalen Schwefels angenommen werden. In Anlehnung an die postulierte Funktion von *hxB* und *ma-l* werden die von ihnen kodierten Proteine als Molybdän-Cofaktor-Sulfurase (Moco-Sulfurase) bezeichnet. Die Beobachtung, daß heteroallele *Drosophila ma-l* Mutanten (Glassman & Pinkerton, 1960; Chovnick *et al.*, 1969; Finnerty, 1976) genauso wie heteroallele *Aspergillus hxB*-Mutanten (Hartley, 1970) zu intragenischer Komplementation in der Lage sind, könnte sogar auf eine Struktur des Proteins aus mehreren unabhängigen Domänen hindeuten (Amrani *et al.*, 2000). Interessanterweise sind für Prokaryonten keine Moco-Sulfurase-Mutanten oder gar entsprechende Loci beschrieben, obwohl diese durchaus Monooxo-Mo-Hydroxylasen wie die

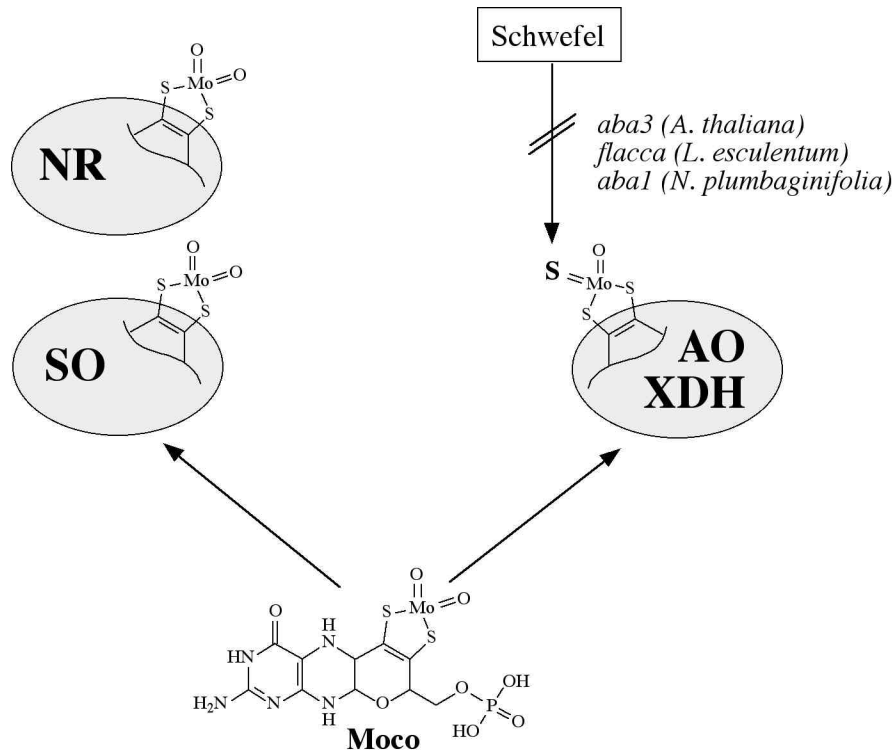
Aldehydoxidoreduktase (z.B. *Desulfovibrio gigas*) und die XDH (z.B. *Rhodobacter sp.*) besitzen.

## 1.6 Die Molybdän-Cofaktor-Sulfurase ABA3 aus *Arabidopsis thaliana*

Putative Moco-Sulfurase-Mutanten mit einem ähnlichen Phänotyp wie *ma-l* und *hxB* sind später auch für weitere Eukaryonten beschrieben worden. Bei Säugern tritt die sogenannte Xanthinurie Typ II auf, die sich durch den simultanen Verlust der Aktivitäten von XDH/XO und AO kennzeichnet, während die SO unbeeinträchtigt bleibt (Reiter *et al.*, 1990). Die Ausprägung dieser autosomal-rezessiven Erbkrankheit wird jedoch wesentlich durch die XDH bestimmt, die normalerweise die Degradation von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure, dem natürlichen Endprodukt des Purin-Metabolismus, katalysiert. Homozygote Mutanten akkumulieren Xanthin, und in geringerem Maße auch Hypoxanthin anstelle von Harnsäure. Die dadurch auftretenden Symptome können von einer drastischen Reduktion des Harnsäuregehaltes in Blutplasma und Urin, Xanthin-Steinen in den Nieren über Harnweg-Infektionen bis hin zu akutem Nieren-Versagen reichen (Stone & Simmonds, 1991). Symptome, die auf den Verlust der AO-Aktivität zurückzuführen sind, treten in solchen Mutanten hingegen nicht erkennbar hervor. Es ist jedoch bekannt, daß die Säuger-AO an der Hydroxylierung mehrerer heterozyklischer Verbindungen beteiligt ist und auch die Oxidation von Retinal zu Retinolsäure katalysiert (Tomita *et al.*, 1993). Vermutlich übernimmt sie darüber hinaus eine Funktion innerhalb des Detoxifizierungssystems (Beedham, 1985). So sind beispielsweise Rohextrakte aus der Leber von Affen, mit dem AO-spezifischen Inhibitor Menadion behandelt, nicht mehr in der Lage, bestimmte Drogen in für den Organismus weniger schädliche Formen zu überführen (Kitamura *et al.*, 2001).

Auch pflanzliche putative Moco-Sulfurase-Mutanten zeichnen sich durch den simultanen Verlust der Aktivitäten von XDH und AO aus, während die Aktivität der NR erhalten bleibt oder sogar erhöht ist (Abb. 1.3). Anders als in Säugern wird der Phänotyp von XDH- und AO-defizienten Pflanzen jedoch im Wesentlichen durch den Verlust der AO-Aktivitäten bestimmt. So weisen die *aba1*-Mutante aus *Nicotiana glauca* (Parry *et al.*, 1991; Leydecker *et al.*, 1995), die *flacca*-Mutante aus *Lycopersicon esculentum* (Marin & Marion-Poll, 1997) sowie die *aba3*-Mutante aus *Arabidopsis thaliana* (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1997) eine gestörte Stomataregulation, verbunden mit einem welkigen Habitus, eine verminderte Streßtoleranz sowie eine reduzierte Samenruhe auf. Alle Merkmale gehen dabei auf die

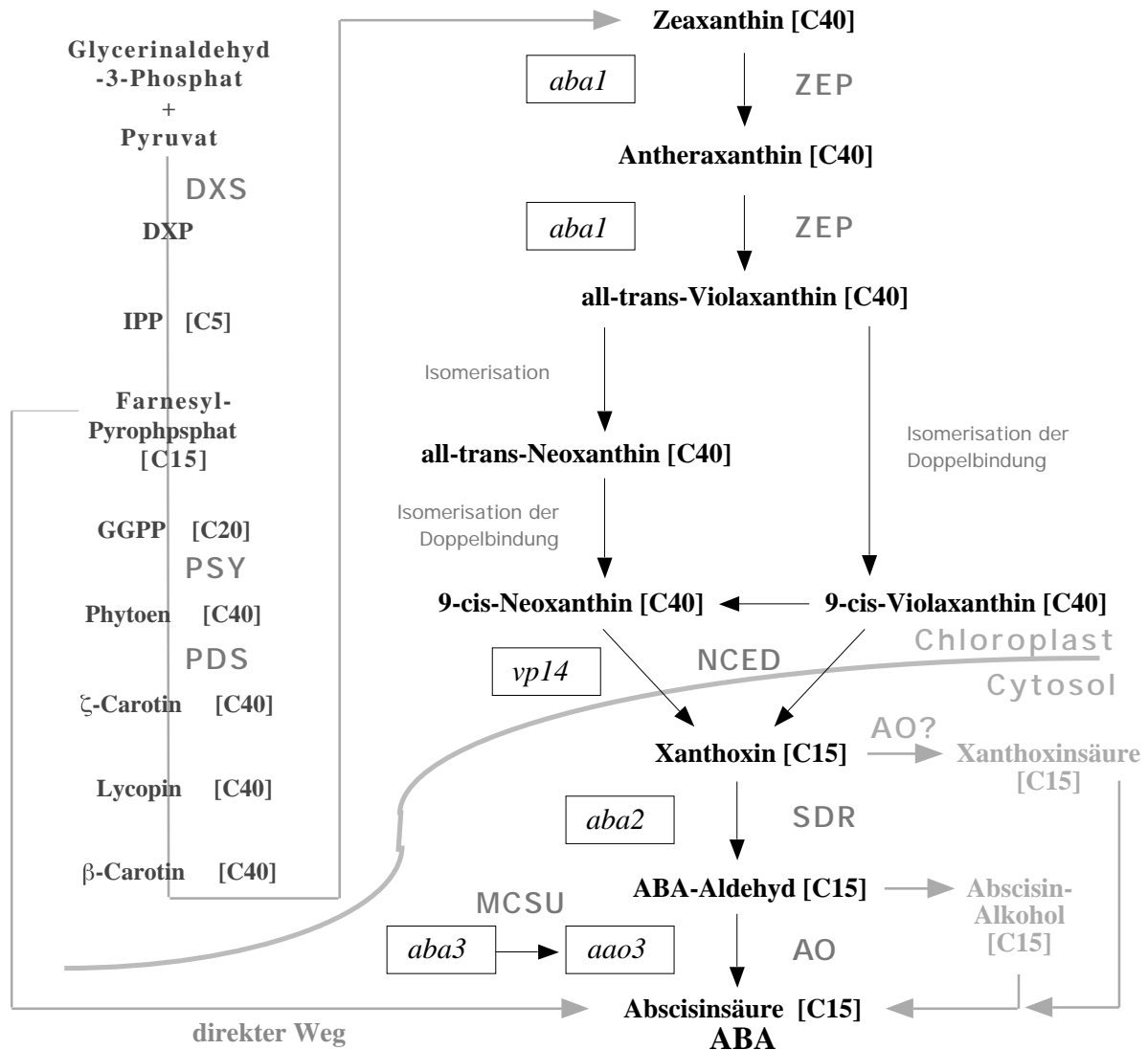
Reduktion des Pflanzenhormons Abscisinsäure (ABA) zurück, dessen Synthese in einem letzten Schritt von einer AO katalysiert wird. Pflanzen besitzen bis zu vier Isoformen der AO, die mit unterschiedlicher Effizienz alle in der Lage sind, die ABA-Vorstufe Abscisin-Aldehyd zu ABA umzusetzen (z.B. *A. thaliana*; Seo *et al.*, 2000b).



**Abb. 1.3: Trennung der pflanzlichen Molybdoenzyme in Dioxo-Mo-Enzyme und Monooxo-Mo-Hydroxylasen.** Angedeutet ist die biochemische Läsion aufgrund der Moco-Sulfurase-Defizienz in den Mutanten *aba3*, *flacca* und *aba1*. Ob die postulierte Sulfurierung von AO und XDH an bereits inkorporierten Moco oder davor stattfindet, ist unklar.

Die *aba3*-Mutante aus *Arabidopsis thaliana* besitzt jedoch keine detektierbare AO-Aktivität mehr, so daß die AO-abhängige und unter Streß bis zu 90% ausmachende "indirekte" ABA-Synthese fast vollständig unterbleibt (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996). Den für das Überleben dieser Mutante notwendigen basalen ABA-Gehalt liefern der sogenannte "direkte Weg" der ABA-Synthese sowie ein Nebenweg über akkumulierte ABA-Intermediate wie Xanthoxin und Abscisin-Alkohol (Abb. 1.4; Seo & Koshiba, 2002). Da die Expression vieler Streßresistenz-vermittelnder Gene jedoch an eine Erhöhung des basalen ABA-Gehaltes gebunden ist (Chandler & Robertson, 1994), ist eine Adaptation an besondere Streßbedingungen für die *aba3*-Mutante nicht möglich. ABA-Biosynthese-Mutanten wie die *aba3* entwickeln aus diesem Grund weder

Kälte-Toleranz (Gilmour & Tomashow, 1991; Heino *et al.*, 1990) noch Austrocknungs-Resistenz (Vartanian *et al.*, 1994). Eine Behandlung von *aba3*-Rohextrakten mit Dithionit und Sulfid stellt jedoch die Fähigkeit zur AO-abhängigen Umsetzung von Abscisin-Aldehyd zu ABA wieder her, wodurch die Beteiligung des *aba3*-Proteins an der posttranslationalen Modifikation des Mocos von AOs (und XDH) und seine Bedeutung innerhalb der ABA-Biosynthese unterstrichen wird (Schwartz *et al.*, 1997).



**Abb. 1.4: Abscinsäure-Biosynthese in höheren Pflanzen nach Seo & Koshiba (2002).** Der Hauptweg der ABA-Biosynthese (indirekter Weg) von Zeaxanthin bis ABA ist in schwarz dargestellt. Daneben sind der direkte Weg und Nebenwege von Mutanten der letzten beiden Schritte des indirekten Weges berücksichtigt (DXS: Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase; DXP: 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat; IPP: Isopentenylpyrophosphat; GGPP: Geranylgeranyl-Pyrophosphat; PSY: Phytoen-Synthase; PDS: Phytoen-Desaturase; ZEP: Zeaxanthin-Epoxidase; NCED: 9-cis-Epoxycarotinoid-Dioxygenase; SDR: "Short-Chain" Dehydrogenase/Reduktase; AO: Aldehydoxidase; MCSU: Molybdän-Cofaktor-Sulfurase). In Kästchen angegeben sind entsprechende für diese Schritte beschriebene Mutanten.

Unter Berücksichtigung aller aufgeführten Aspekte liegt eine Beteiligung von *aba3* an der Kontrolle der Biosynthese der Phytohormone ABA und Indolylessigsäure (IAA) in *Arabidopsis thaliana* nahe. Indem die putative Moco-Sulfurase ABA3 den Moco der jeweils den letzten Schritt der ABA- bzw. IAA-Biosynthese katalysierenden AOs sulfuriert, nimmt sie entscheidenden Einfluß auf die Aktivität der jeweiligen AOs und damit auf den gesamten Phytohormon-Haushalt der Pflanze. Es ist anzunehmen, daß auf ähnliche Weise der Purin-Metabolismus in Pflanzen durch Sulfurierung des Mocos der XDH reguliert wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll mit der Isolierung des *aba3*-Gens aus *Arabidopsis thaliana* die erste pflanzliche putative Moco-Sulfurase für grundlegende Analysen verfügbar gemacht werden. Die Charakterisierung der Expression von *aba3* kann ausgenutzt werden, erste Hinweise auf mögliche regulative Eigenschaften von *aba3* zu erhalten. Desweiteren stehen drei allele, voneinander unabhängige putative *aba3*-Mutanten zur Verfügung, deren biochemische Charakterisierung und deren Mutationen aufzuklären ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit sein soll. In weiterführenden Ansätzen soll darüber hinaus das ABA3-Protein rekombinant überexprimiert und seine Funktionsweise im Hinblick auf die Mobilisierung des terminalen Schwefels sowie auf die Sulfurierung von AO und XDH untersucht werden. Nicht zuletzt ist die Verwandtschaft zu anderen putativen Moco-Sulfurasen wie Ma-1 aus *Drosophila* und HxB aus *Aspergillus* zu überprüfen. Hiermit soll schließlich die Möglichkeit geschaffen werden, das von Mendel & Schwarz (2002) beschriebene aktuelle Modell der Moco-Biosynthese um den letzten Schritt, die posttranslationale Sulfurierung des Mocos von Monooxo-Mo-Hydroxylasen wie AO und XDH, zu erweitern.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Charakterisierung der *Arabidopsis*-Mutanten *aba3.1*, *aba3.2* und *13.5*

Für die Aktivierung pflanzlicher Aldehydoxidasen (AO) und Xanthindehydrogenasen (XDH) wird eine Sulfurase benötigt, die in einer posttranslationalen Reaktion den sogenannten terminalen Schwefel an das Mo-Atom im Molybdän-Cofaktor (Moco) anfügt. Dieser wird sowohl von AOs als auch von der XDH als essentieller Cofaktor inkorporiert, wie dies auch für die anderen pflanzlichen Mo-Enzyme Nitratreduktase (NR) und Sulfitoxidase (SO) der Fall ist. Letztere entwickeln ihre volle Aktivität jedoch ohne diesen letzten Schritt der Moco-Reifung. Sie sind demzufolge auch nicht betroffen, wenn es zu einem Verlust der Moco-Sulfurase-Aktivität, z. B. durch Mutationen, kommt. Für *Arabidopsis thaliana* sind zwei solcher Mutanten, für die man eine Moco-Sulfurase-Defizienz annimmt, bereits isoliert und recht gut charakterisiert (Leon-Kloosterziel *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1997). Da sich ihr Phänotyp neben dem Ausfall der Aktivitäten von AO und XDH bei gleichzeitigem Erhalten der NR-Aktivität (SO nicht gemessen) vor allem durch die starke Reduktion des Abscisinsäure (ABA)-Gehaltes manifestiert, wurden sie der Klasse der ABA-Mutanten zugeordnet. Man gab ihnen und dem betroffenen Locus die Bezeichnung *aba3*, da sie von drei isolierten, nicht-allelen *Arabidopsis*-Mutanten den zuletzt stattfindenden Schritt innerhalb der ABA-Biosynthese zu beeinflussen scheinen (Schwartz *et al.*, 1997).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, diese Mutanten, bezeichnet als *aba3.1* und *aba3.2*, noch genauer zu charakterisieren und evtl. mit Hilfe dieser das den *aba3*-Phänotyp bewirkende Gen zu isolieren. Als dritte putative *aba3*-Mutante sollte hierzu auch eine bisher unveröffentlichte und nur wenig charakterisierte Mutante, die T-DNA getaggte *13.5*, herangezogen werden. Die Isolierung dieser Mutante erfolgte ehemals über die Fähigkeit der Mutante, in Gegenwart des Giberellin-Biosynthese-Inhibitors Paclobutrazol zu keimen und über die nicht vorhandene XDH-Aktivität (A. Marion-Poll, persönliche Mitteilung). Da außerdem auch hier die NR-Aktivität unbeeinflusst zu sein schien, wurde auf eine zu *aba3.1* und *aba3.2* allele Mutation geschlossen. Über die in das Genom der *13.5*-Mutante integrierte T-DNA ergab sich hier zudem erstmalig eine Gelegenheit, erste Sequenzinformationen über das möglicherweise betroffene, putative *aba3*-Gen zu erhalten, indem man die diese T-DNA flankierenden genomischen Bereiche

isoliert. In einer ersten Charakterisierung dieser Mutanten sollen demnach folgende Fragen beantwortet werden:

1. Weisen tatsächlich alle drei Mutanten einen *aba3*-Phänotyp auf?
2. Sind in diesen Mutanten dieselben Loci betroffen, d. h. sind sie allel zueinander? Und wenn dies der Fall ist, gibt es dennoch phänotypische Unterschiede?
3. Wie ist der T-DNA Tag in das Genom der *13.5*-Mutante integriert und welche Rolle spielt dieser im Zusammenhang mit dem Phänotyp?

### **2.1.1. Physiologische und biochemische Charakterisierung der Mutanten**

In der bereits vorangegangenen biochemischen Charakterisierung der Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* (Schwartz *et al.*, 1997) wurde gezeigt, daß keine Aktivitäten von AO und XDH mehr detektierbar sind. Dies führt unter anderem zu einer starken Reduktion des ABA-Gehaltes, verbunden mit gestörter ABA-abhängiger Stomataregulation und einem daraus folgenden welkigen Habitus. Ebenfalls durch ABA-Mangel bedingt, kommt es zu fehlender Samen-Dormanz, d. h. zur Keimung von Samen ohne vorangegangene Samenruhe. Diese wird normalerweise in ruhenden Samen durch ABA erhalten und muß durch die Synthese von Giberellinsäure (GA) durchbrochen werden. ABA-Mutanten, wie die *aba3.1*, keimen jedoch auch ohne GA und können so in Gegenwart eines GA-Synthese-Inhibitors wie Paclobutrazol oder Tetcyclacis vor einem Wildtyp-Hintergrund selektiert werden.

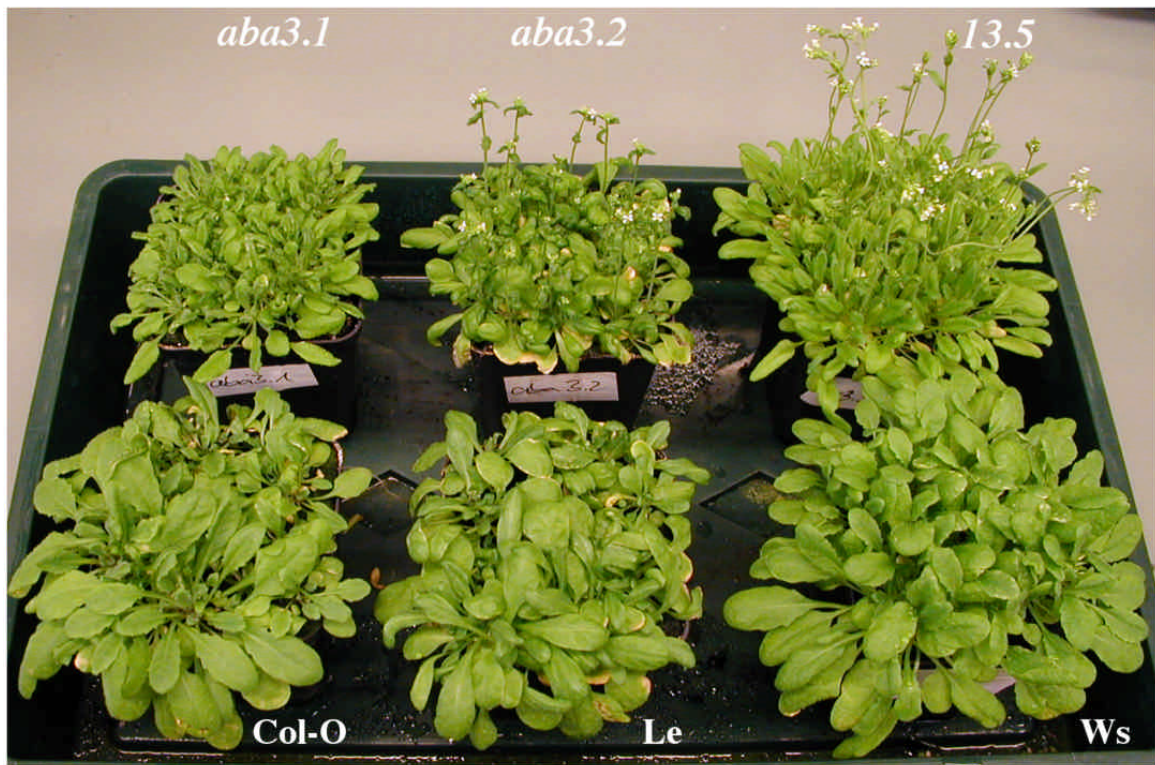
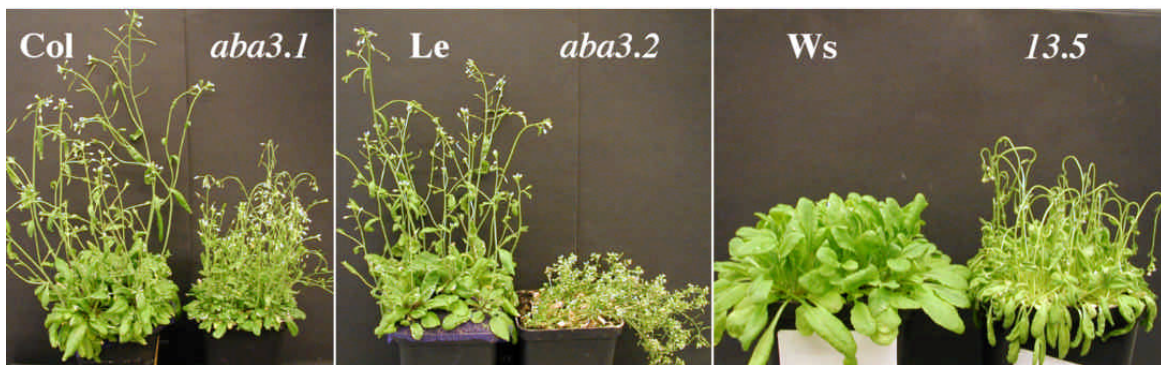
Im Rahmen der Mutanten-Charakterisierung sollte zum einen untersucht werden, ob sich dieses Keimungsverhalten auch für die Mutanten *aba3.2* und *13.5* bestätigen läßt und inwiefern sich die visuell zu erfassenden Phänotypen der Mutanten gleichen oder unterscheiden. Zum anderen sollen in allen Mutanten die Aktivitäten von AO und XDH sowie der NR überprüft werden, um zu zeigen, ob die Art der vorliegenden Mutation tatsächlich eine den Moco betreffende ist. Da eine Behandlung mit Sulfid und Dithionit die Wiederherstellung von AO- und XDH-Aktivitäten in Moco-Sulfurase-Mutanten durch chemisches Anfügen des terminalen Schwefels bewirkt, soll speziell dieser Versuch dazu dienen, die Mutanten zu klassifizieren.

Bei der Untersuchung des Keimungsverhaltens von Mutanten und Wildtypen in Gegenwart von 10 µM des GA-Synthese-Inhibitors Tetcyclacis konnte festgestellt werden, daß die Wildtypen

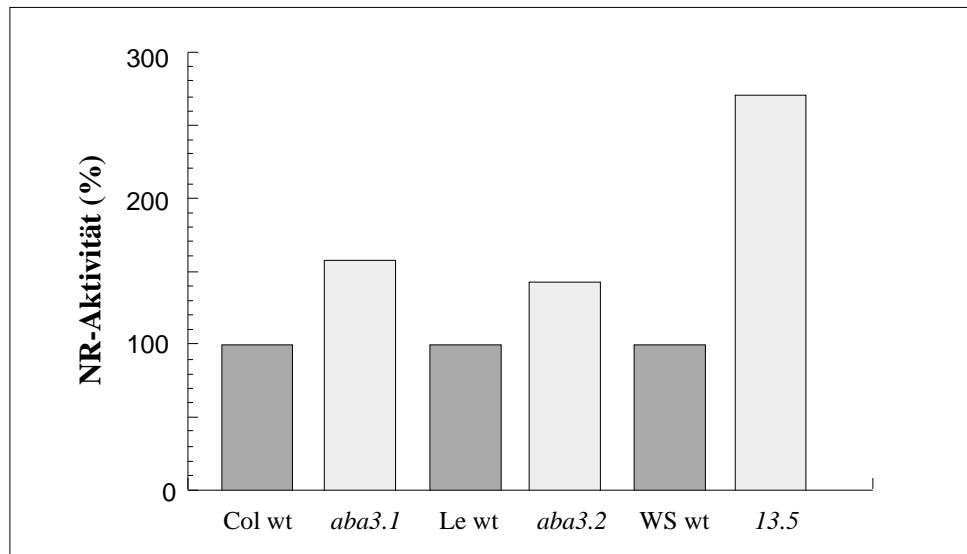
Col-O, Le und Ws wie erwartet nicht keimen, die Mutanten hingegen nach kurzer Zeit schon recht kräftige Keimlinge ausgebildet hatten. Unter den Mutanten scheint der Verlust der Samen-Dormanz in der *13.5*-Mutante am stärksten ausgeprägt, da diese im Vergleich zur *aba3.2*-Mutante stets einige Tage früher keimte, während die *aba3.1*-Mutante erst nach weiteren 5-7 Tagen die ersten Keimlinge hervorbrachte. Die Keimungsfähigkeit in Anwesenheit von Tetacyclacis bzw. der Verlust der Samen-Dormanz ist demnach in allen drei Mutanten ausgeprägt, jedoch mit unterschiedlicher Intensität. Insofern verhalten sich also alle drei Mutanten zumindest ähnlich. Läßt man Mutanten und Wildtypen zu adulten Pflanzen heranwachsen, so erkennt man deutliche Unterschiede sowohl im Habitus als auch im Blühverhalten. Während alle drei Wildtypen unter Standard-Kulturbedingungen nach ca. 5 Wochen einen kräftigen Habitus präsentieren und mit der Blühphase gerade beginnen, erscheinen alle drei Mutanten deutlich fragiler im Wuchs und haben bereits nach 3-4 Wochen zu blühen begonnen. Hierbei fällt besonders auf, daß die Mutanten *13.5* und *aba3.2* stets noch vor der *aba3.1*-Mutante Blüten ausbilden (Abb. 2.1 A). Ein weiteres ABA-Mutanten-spezifisches Merkmal ist eine deutlich verminderte Streßtoleranz, was sich vor allem unter Kulturbedingungen mit geringer relativer Luftfeuchte (<70%) und insbesondere bei ausgesprochenem Trockenstreß in einem auffällig welkigen Habitus äußert (Abb. 2.1 B).

Die biochemische Analyse zeigt, daß die Nitratreduktase-Aktivität im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp in den Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* auf ca. 150%, in der *13.5*-Mutante jedoch sogar auf fast 300% erhöht ist (Abb. 2.2). Dies bedeutet, daß in keiner der Mutanten ein *cnx*-Gen der Moco-Biosynthese betroffen ist, da dies zum Ausfall aller Molybdoenzyme, und somit auch der NR, geführt hätte.



**A****B**

**Abb. 2.1: Habitus von Wildtypen und Mutanten.** (A) Vier Wochen alte Mutanten im Vergleich mit ihren jeweiligen korrespondierenden Wildtypen. (B) Dieselben Pflanzen nach Exposition unter Laborbedingungen bei ca. 50% relativer Luftfeuchte und 21°C. Während die Wildtypen unter diesen Bedingungen ihren Habitus beibehalten, erscheinen die Mutanten welk und schlaff. Die Mutante 13.5 wurde nach 4 Wochen diesem Streß für nur 90 min ausgesetzt, da sie in diesem Alter bereits in voller Blüte ist. Der entsprechende Wildtyp WS hat daher mit dem Blühen noch nicht begonnen. Die Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* wurden erst nach 5,5 Wochen für jeweils 5 h gestreßt. Daher stehen auch die Wildtypen Col-O und Le bereits in der Blüte.

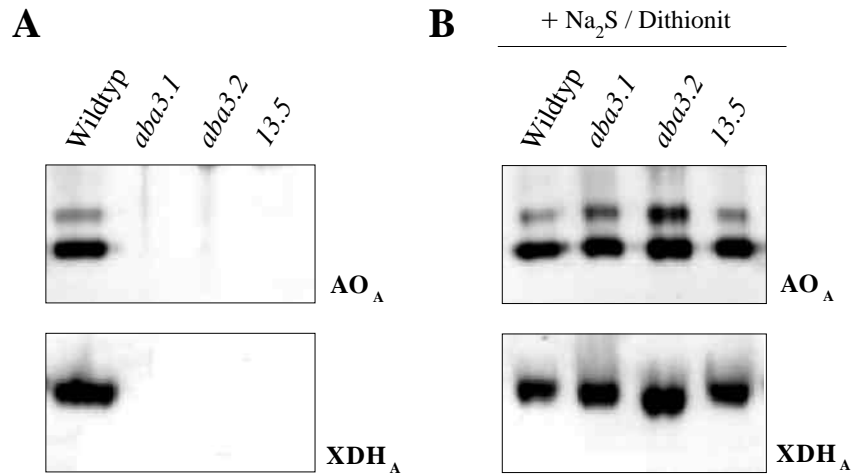


**Abb. 2.2: Nitratreduktase-Aktivität der putativen Moco-Sulfurase-Mutanten und deren korrespondierenden Wildtypen.** Die Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* weisen leicht erhöhte NR-Aktivitäten gegenüber ihren korrespondierenden Wildtypen Col und Le auf, die Mutante *13.5* sogar eine Verdreifachung gegenüber Ws. Die Werte wurden nach einer Doppelbestimmung der NR-Aktivitäten von Blatt-Rohextrakten erhalten.

Sollte aber in den vorliegenden Mutanten die Moco-Sulfurase ABA3 betroffen sein, so müßte es zum gemeinsamen Verlust der Aktivitäten von AO und XDH kommen, die jedoch durch Behandlung mit Sulfid und Dithionit wieder restauriert werden sollten. In entsprechenden Versuchen konnte gezeigt werden, daß auch nach Einsatz von 250 µg Protein aus Blatt-Rohextrakten in allen drei *Arabidopsis*-Mutanten weder AO- noch XDH-Aktivitäten detektierbar sind (Abb. 2.3 A). Behandelt man solche Extrakte jedoch unter anaeroben Bedingungen mit Sulfid und Dithionit, so kann eine vollständige Wiederherstellung dieser Aktivitäten, und zwar in allen drei Mutanten, erreicht werden (Abb. 2.3 B).

Unter Berücksichtigung der bisherigen Daten liegt der Schluß nahe, daß in allen drei Mutanten derselbe Gen-Locus betroffen ist bzw. daß diese Mutationen allel sind. Dieses wird zusätzlich durch das Ergebnis eines Kreuzungsversuches untermauert: Durch Kreuzung der T-DNA getaggtten und dadurch kanamycinresistenten Mutante *13.5* mit der *aba3.1*- bzw. der *aba3.2*-Mutante konnte nach Ernte der Samen von *aba3.1* bzw. *aba3.2* und Selektion auf kanamycinresistente Nachkommen niemals eine Rekonstitution der AO- und XDH-Aktivitäten erzielt werden. Da aufgrund dieses Versuches angenommen werden muß, daß sowohl *aba3.1* mit *13.5* als auch *aba3.2* mit *13.5* allel zueinander sind, kann indirekt auch auf eine allele Mutation in *aba3.1* und *aba3.2* geschlossen werden. Diese Kreuzungskombination wurde jedoch nicht

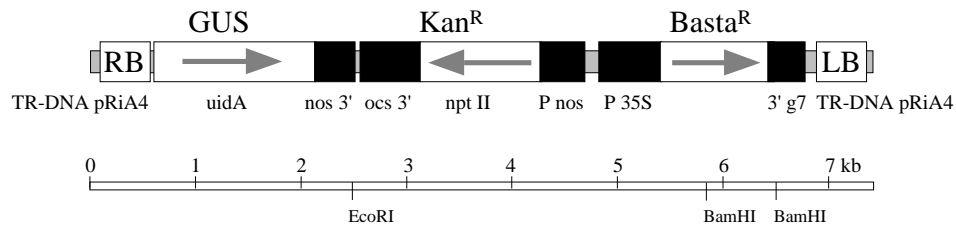
durchgeführt, da hier nicht, wie im Falle einer Kreuzung mit der *13.5*-Mutante, schnell auf kanamycinresistente Nachkommen selektiert werden konnte.



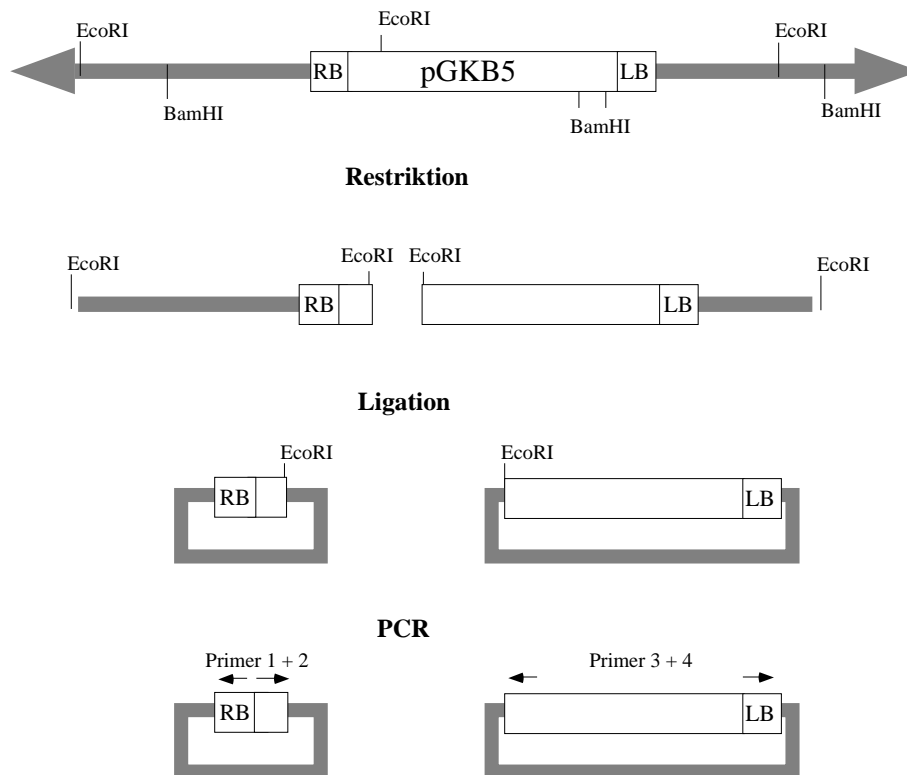
**Abb. 2.3:** AO- und XDH-Aktivitäten der drei Mutanten *aba3.1*, *aba3.2* und *13.5* vor (A) und nach (B) Behandlung mit Sulfid (Na<sub>2</sub>S) und Dithionit. Für den Nachweis der Aktivitäten von AO und XDH wurden jeweils 250 µg Protein aus Blatt-Rohextrakten auf nativen PA-Gelen aufgetrennt. Zum Nachweis der AO-Aktivität im Gel diente ein Gemisch aus Indol-3-Aldehyd und 1-Naphthaldehyd als Substrat, zum Nachweis der XDH-Aktivität wurde Hypoxanthin verwendet.

### 2.1.2. Molekulare Charakterisierung der T-DNA Insertion in der Mutante *13.5*

Die Charakterisierung der Integration erfordert die Isolierung der den T-DNA Tag flankierenden genomischen Bereiche aus dem Genom der Mutante. Da genaue Sequenzinformation über den verwendeten T-DNA Vektor, den pGKB5 (Abb. 2.4; Bouchez *et al.*, 1993), vorlagen, wurde dazu in dieser Arbeit die inverse PCR herangezogen. Hierzu wurde zunächst genomische DNA der Mutante mit den Restriktionsenzymen EcoRI bzw. BamHI verdaut, die ein- bzw. zweimal in der integrierten T-DNA schneiden. Anschließend wurden die einzelnen Fragmente der verdauten genomischen DNA religiert, wobei diejenigen zirkularisierten Fragmente von weiterem Interesse waren, die aus partieller T-DNA und flankierenden genomischen DNA-Bereichen bestanden. Mit Hilfe von spezifischen Primern, die innerhalb der T-DNA binden, aber zu den flankierenden Bereichen hin gerichtet waren, wurde die unbekannte genomische DNA mitsamt den T-DNA Endstücken amplifiziert und anschließend kloniert (Abb. 2.5).



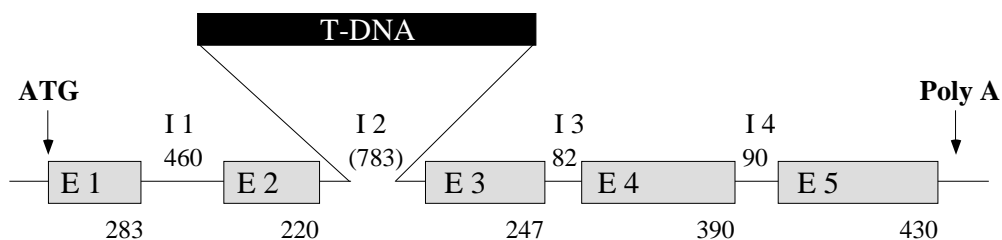
**Abb. 2.4: Schematische Darstellung der T-DNA des Vektors pGKB5 (Bouchez *et al.*, 1993).** Unmittelbar neben der am Genom angrenzenden rechten Grenze der T-DNA (RB, „right border“) befindet sich der 5'-Bereich des promotorlosen GUS-Gens für Promotor-Trapping-Versuche. Die folgenden Gene der Neomycin-Phosphotransferase bzw. Phosphinothricin-Acetyltransferase verleihen transgenen Pflanzen Resistenzen gegen Kanamycin ( $\text{Kan}^R$ ) bzw. gegen das Herbizid Basta. Die linke Grenze (LB, „left border“) begrenzt das in das Pflanzengenom integrierte T-DNA Fragment auf der anderen Seite.



**Abb. 2.5: Prinzip der inversen PCR.** Das Prinzip der in dieser Arbeit durchgeführten inversen PCR ist hier am Beispiel von EcoRI-verdauter genomischer DNA der T-DNA getaggtten Mutante *I3.5* dargestellt. Nach Verdau von ca. 600 ng genomischer DNA mit EcoRI wurde die DNA phenolisiert, präzipitiert und in einem Volumen von 0,5 ml religiert. Anschließend wurde die DNA erneut gefällt, in 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und je 5  $\mu\text{l}$  davon in zwei unabhängigen PCR-Ansätzen mit unterschiedlichen Primer-Kombinationen (1+2 und 3+4) amplifiziert. Nach demselben Prinzip wurde auch mit BamHI-verdauter genomischer DNA verfahren.

Die inverse PCR erbrachte im Falle von EcoRI-verdauter genomischer DNA ein die linke Grenze der T-DNA flankierendes Fragment von 1441 bp. Ein die rechte Grenze flankierendes Fragment konnte hingegen nicht amplifiziert werden. Im Falle von BamHI-verdauter DNA ergab sich ebenfalls an der linken Grenze ein Fragment von 792 bp, wohingegen auch hier kein Amplifikat für die rechte Grenze erhalten wurde. Nach Klonierung der PCR-Fragmente in den TA-Cloning Vektor pGEM-T Easy und anschließender Sequenzierung zeigte sich, daß beide Fragmente denselben Abschnitt genomischer DNA repräsentieren, d. h., daß das Ergebnis somit gleichzeitig reproduziert wurde.

Datenbank-Analysen mit den so erhaltenen Sequenzen erbrachten aufgrund des zur damaligen Zeit noch recht lückenhaften *Arabidopsis* Genom-Projektes zunächst keine weiteren Hinweise auf den genomischen Ursprung der isolierten Bereiche. Da die Sequenzen zudem keine größeren exprimierenden Bereiche zu enthalten schienen, wurde das 1441 bp-Fragment radioaktiv markiert und als Sonde für einen genomischen Southern mit Wildtyp-DNA eingesetzt. Ein mit der Sonde hybridisierendes 4264 bp XbaI-Fragment wurde aus dem Gel eluiert, in pBluescript kloniert und einer Exon/Intron-Analyse unterzogen. Nachdem mögliche Translationsstart- und Stopstellen definiert wurden, konnte mit Hilfe von spezifischen Primern gegen die angenommenen 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTRs) über RT-PCR eine ca. 1,7 kb große cDNA mit einem offenen Leseraster von 1557 bp, bestehend aus 5 Exons, generiert werden (Abb. 2.6). Sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene konnten Homologien zu Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen ausgemacht werden.



**Abb. 2.6: Struktur des von der T-DNA Integration betroffenen Cytochrom P450-homologen Gens.** Die T-DNA ist im zweiten Intron des Gens integriert und beeinflusst somit die Struktur des Gens empfindlich.

Zwar wies das aus der isolierten cDNA resultierende Protein keinerlei Homologien zu putativen Moco-Sulfurasen anderer Organismen auf, jedoch stellte sich die genomische Lokalisation als sehr interessant heraus: Im Verlauf dieser Arbeit wurde der genomische BAC-Klon

F20D23/AC007651 in die Datenbanken gestellt, der die gesamte genomische Umgebung des isolierten Abschnittes enthielt. Mit dessen Hilfe konnte der T-DNA Tag bzw. der Cytochrom P450-homologe Locus einer zuvor auch für *aba3* beschriebenen Position auf Chromosom 1 in der Nähe von 10 cM (Leon-Kloosterziel *et al.*, 1996) zugeordnet werden. Zu diesem Zeitpunkt konnte nicht ausgeschlossen werden, daß nicht die Moco-Sulfurase selbst, sondern eventuell ein indirekt an der Sulfurierung beteiligtes Cytochrom P450-homologes Gen in den Mutanten *aba3.1*, *aba3.2* und *13.5* betroffen ist. Versuche zur Komplementation der Mutanten mit der isolierten cDNA scheiterten jedoch, ebenso konnte mit antisense-Ansätzen nie ein *aba3*-Phänotyp erzielt werden.

## **2.2. Isolierung und Charakterisierung des *aba3*-Gens**

Aufgrund der Homologien von bekannten Moco-Sulfurasen anderer Organismen wurde angenommen, daß auch das pflanzliche Pendant in Struktur und Funktion ähnlich stark konserviert ist, wie die Moco-Biosynthese und die daran beteiligten Proteine selbst. Aus diesem Grund wurde versucht, das *aba3*-Gen über Sequenzhomologien zu anderen Moco-Sulfurasen zu isolieren. Da entsprechend homologe Klone in den *Arabidopsis*-Datenbanken zwar enthalten waren, jedoch weder der bereits bekannten genomischen Lokalisierung von *aba3* entsprachen, noch in Komplementations- oder antisense-Versuchen mit stabilen *Arabidopsis*-Transformanten vielversprechende Ergebnisse erbrachten, wurde der Weg über die RT-PCR mit degenerierten Primern beschritten.

### **2.2.1. Design von degenerierten Primern anhand von Sequenzen bekannter putativer Moco-Sulfurasen anderer Organismen**

Auf der Grundlage von Nukleinsäuresequenz-Homologien der bisher beschriebenen putativen Moco-Sulfurasen aus *Drosophila melanogaster*, *Aspergillus (Emmericella) nidulans* und *Bos taurus* wurden degenerierte Primer hergestellt, die innerhalb der vermuteten codierenden Region der *Arabidopsis* Moco-Sulfurase *aba3* binden und dadurch ein cDNA-Amplifikat erzielen sollten. Zunächst war dazu ein Alignment der genannten Sulfurasen auf Protein-Ebene notwendig, um die konservierten Regionen definieren zu können (Abb. 2.7).

Ma-1	-----MTSYRPEFSASEQSIDAEFSRLASNSVYLDHAGTTLTLYAESQVTAAAEQLRNV	55
MCSU	-----MQSRQPRALLPR-----SPGTVYLDHAGTTLFPQSQITSFMKDLMENV	43
HxB	MNLSKGTAAAYCSGYSIEDVDVIREREYPLLKDTTYLDHAGTTLYANSLIHSFGRDLTGNL	60
	: . . . . . : . . . . . : . . . . .	
Ma-1	ICNPH----TCRLTGDFVDQVRFKILEFFNTTAEDYHVIFTANATAALSLVAENFDFGSS	111
MCSU	YGNPHSQNISSKLTHTDVEQVRFRI LAHFHTSPEDYTVIFTSGSTAALKLVAEAFPPWVSP	103
HxB	YGNPHSMSASSQLSAQRAGRYSLRALRFFNADPDEFDLVFVANATAGIKLVADALQNSPQ	120
	*** : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .	
Ma-1	GE-----FHFCQENHTSVLGMRRVRRENGIYML--RENEISGGKHKANGKVHEVSGKTG	163
MCSU	GPEGSGSCFCYLTDSHTSVVGMRKITAAMNVSSIPVRPEDMWSAERQDAAAAGDPAGQP-	162
HxB	GF-----WGYGYVDAHTSLVGVRELAKMGSRCFVNEDEVDSWISG-----LGSRREES	168
	* : : : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .	
Ma-1	NSLLTFSAQCNFSGYKIPLEVIEQIQIDGLAKPGKELWSSLGEKKKNMHNDYYICLDAAS	223
MCSU	PHLFCYPAQSNFSGTRYPLSWIGEVKSG-----RRRPASRPGKWFVLLDAAA	209
HxB	LGLFAYPAQSNMNGRRVPMRWCEQIRAQ-----KENADNMIYTL LDAAS	212
	* : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .	
Ma-1	FVATSPDLQ--KYRPDYVCLSFYKIFGYPTGVGALLVSRRAEVEFQKRRFFGGGTINYA	281
MCSU	FVGTSPDLDS--VHQADFVPISFYKIFGFPTGLGALLVNNRLAALLRKT-YFGGGTAAAY	266
HxB	FVSTSPDLDSKIAAAPDFTVLSFYKIFGFPD-LGALIVRKSSGDVFKHRKFFGGGTVDMV	271
	** . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .	
Ma-1	YPHAMDYQLRE--TFHQRYEDGTL PFLSIVGLLEGFRTLRLVLPRTDEFSTMERISRHFV	339
MCSU	LAGDDFYVPRE--SVAERFEDGTISFLDVIALKHGFDALERLTG-----GMESIRQHTF	318
HxB	LTGDNPNWHAKKQSSIHQSLDGTL P FHSIIALDSAFETHGRLFR-----SMENVASHTR	325
	. : : . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .	
Ma-1	GLAKYLEDQLRQLHHPNGEPLVKLYN--KVGYQDKSRQGGIVAFNVRTESGSFVGFGIEA	397
MCSU	TLAQYTYTALSSRLYPNGAPVVQIYS--DSDFSSPEVQGPVIFS NVLDDHGNVVGYSQVD	376
HxB	FLAKRLRDRMNALKHYNGSKVCQLYMSPNSSYDDASSQGPILAFNLNRSGMWIKSEVE	385
	** : : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .	
Ma-1	CVAALHGILLRTGCFCNIGACQYYLGLDEDALDAIYKRAGRICGDYFDLIDGQPTGAVRV	457
MCSU	KMASLHNIHVRTGCFCNTGACQRHLGISDEMVKHLQ-AGHVCGDDVDLIDGQPTGSVRI	435
HxB	RLASIKNIQIRSGTLCNPGGTALSLGWTGADMLRHFS-AGMRCGDDHDIMDERPTGILRI	444
	: . . . . : . . . . : . . . . : . . . . : . . . . : . . . .	
Ma-1	SFGYMTTIQDVKLLQMLRSSYLATKP-LQRIQFIEEQAEQLPP-----LLKER-	505
MCSU	SFGYMSTLEDAQAFLRFIIATRLHSSH-GQPLPLATPGEAGAPPEDSEAQNAMPAARARG	494
HxB	SLGAMSSLTVDVDTFIAFLEEFYVDKPPEGLPVPLTGNVSLHQPS-----	488
	* : * . . . . : . . . . : . . . . : . . . . : . . . .	
Ma-1	-----VQLLRPKLLQMA-----	517
MCSU	SSSPQEDTSPHSGVWNNSP TAVDAEGLCPPLLEATGTQQTSEKAADVDPGDLRSHVITN	554
HxB	-----FYVESLS-----	495
	. : *	
Ma-1	--IYPVKSCAAFKIELPGSWPLTDQGLKYDREWMI VDMN-GMAL TQKRCTELCLIRPVIK	574
MCSU	LFLYPIKSCAAFEVIR---WPLGSQGLLYDRSMVNVNHN-GICLSQKQEPRLCLIQPFID	610
HxB	--VYPIKSCGAFRIPDGQRWEVRREGLAWDREWCLVHQGTGITLNQKRYPRMALIRPTLD	553
	: ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : **	
Ma-1	VDQLELQFGE--NSTISVPLSLDDQAADTAKCVSKVCQPVEGLDCG-----D	620
MCSU	LQRRIMVIKA---QGMEPIEVPLEENSEQVQICQSKVCADRVNTYDCG-----E	656
HxB	LERCLLRITCGEANSRDGKTLEISLNRIGTNSLT TSLCQNASKPSTVCGDKVVLQAYTSP	613
	: : : : . . : . . : . . : . . : . . : . .	
Ma-1	RVAQWLSENLGMEG-----LRLLRQSG--HRNSSKDQK-----	652
MCSU	KISNWLSKFFGRP-----YHLIKQSSDFQRNAKKKHGKDQSAH-----	694
HxB	AVSRFFTDFLGVPCTLARFP PQSSTRFHSRATAAINRDQNY SQKQSPSMPGSFPQAPSSP	673
	: . . . . : *	
Ma-1	-----LSLVNQAQFLLLNKSSVRSLQFEE-----PLDETVD RFRANIII	691
MCSU	--TTATLSLVNEAQYLLINRSSILELQQQLSTS---CENGKEELFPMNNLISRFRANII T	749
HxB	DPYPTPILLSNESPLLLISRSSVNRLNESIKSASQPCSNPGSAASKKAVAADVFRANVVV	733
	: * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *	

```

Ma-1  DT-----GSAFEELTYKALSIGG-----IQFQVEGPCQRCDMICINQRTGERSPETLTITIS 742
MCSU  NG-----TRAFEEEEKWDEISIGS-----LRFQVLGPCHRCQMIDQQTGQRNQDVFKLS 800
HxB   AENISTAERP YIEDTWASLSIGSGPEQLRFDVLGSCERCQMVCVDQYTGQRGDEPYATLA 793
      .: * .: :***. :*: *.*.***:***: *:*.*. : .::

Ma-1  RLQ--KGRMRFGIYITRIPQDT-----KELEPKEQHMTCTGDVVLVE----- 781
MCSU  ERR--ERKVKFGVYLMHTSLDLSSPCYLSVGSQVLP LLKENMEHHDIPATE----- 849
HxB   KTRKIDRKILFGRHISPVGRPKD-----AENGCLGTIMVGDAVTPSYDNES 839
      . : . : : * : : * :

```

**Abb. 2.7: Aminosäure-Alignment bekannter putativer Moco-Sulfurasen.** Ma-1 (Maroon-like) aus *D. melanogaster*; HxB aus *A. nidulans*; MCSU aus *B. taurus*. (\*) kennzeichnet identische Positionen, (:) stark konservierte und (.) schwach konservierte Regionen.

Aus den konservierten Bereichen der Proteine wurden daraufhin solche ausgewählt, die auch auf Nukleinsäure-Ebene ausreichend gut konserviert waren, um daraus degenerierte Primer abzuleiten. Unter Berücksichtigung von Homologien, GC-Gehalt und *Arabidopsis* Codon-Usage wurden die in Tabelle 2.1 dargestellten Sequenzen für die Herstellung der degenerierten Oligo-Nukleotide ausgewählt.

**Tab. 2.1: Ermittlung der Primer-Sequenzen aus konservierten Protein- bzw. DNA Motiven.** Als Grundlage diente das Alignment in Abb. 2.7. Drei Protein-Motive wurden ausgewählt, die unter den drei Moco-Sulfurasen aus *Drosophila* (*ma-1*), Rind (*mcsu*) und *Aspergillus* (*hxB*) zum einen gut konserviert sind und zum anderen auf DNA-Ebene relativ ausgeglichene GC-Gehalte aufweisen. Die jeweils erste und letzte Aminosäure-Position der Protein-Motive sind angegeben. Alle DNA-Sequenzen sind in 5' 3'-Richtung angegeben. Die schließlich relevanten Primersequenzen sind fett dargestellt.

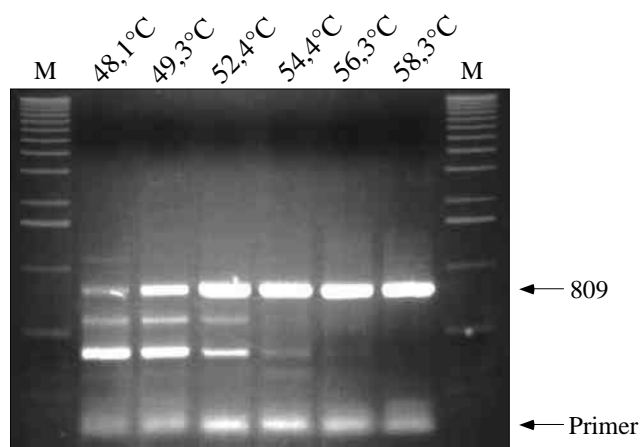
Bezeichnung	Protein-Motiv	entsprechendes DNA-Motiv
<b>ABA3.Deg.1+</b>	ma-1 251 PTGVGALLV 259	CCC ACG GGC GTG GGA GCC CTG CTC GTG
	mcsu 237 PTGLGALLV 245	CCC ACT GGC CTG GGC GCT CTG CTG GTG
	hxB 242 PD-LGALIV 249	CCT GAC --- CTC GGT GCG TTG ATC GTC
	Consensus	CCC ACN GGC CTG GGN GCN CTG CTC GTG
	Primer-Sequenz	<b>CCT ACT GGC CTG GGC GCT CTG CTT GT</b>
<b>ABA3.Deg.1-</b>	ma-1 455 VRVSFGYMT 463	GTA CGG GTA TCT TTT GGC TAT ATG ACA
	mcsu 433 VRISFGYMS 441	GTG AGG ATT TCT TTT GGA TAC ATG TCT
	hxB 442 LRISLGAMS 450	CTA CGG ATC AGC TTA GGT GCT ATG AGC
	Consensus	GTA CGG ATN TCT TTT GGN TAT ATG ACN
	Primer-Sequenz (+ Strang)	GTA AGG ATT TCG TTT GGA TAC ATG TC
	Reverse Complement	<b>GAC ATG TAT CCA AAC GAA ATC CTT AC</b>
<b>ABA3.Deg.2-</b>	ma-1 519 YPVKSAAAF 527	TAT CCG GTA AAG TCT TGT GCC GCC TTT
	mcsu 556 YPIKSAAAF 566	TAC CCA ATC AAG TCC TGT GCA GCA TTT
	hxB 495 YPIKSCGAF 505	TAC GTT ATT ACT TGC GGA GAA GCC AAT
	Consensus	TAC CCN ATN AAG TCC TGT GCA GCC TTT
	Primer-Sequenz (+ Strang)	TAC CCA ATC AAG TCC TGT GCT GCA TTT
	Reverse Complement	<b>AAA TGC AGC ACA GGA CTT GAT TGG GTA</b>



### 2.2.2. Isolierung von *aba3*-cDNAs mittels RT-PCR

Die unter 2.2.1. beschriebenen degenerierten Primer wurden in zwei Kombinationen für die RT-PCR eingesetzt. Da keine Kenntnisse über die *aba3*-Zielsequenz vorlagen, war auch die optimale Primer-Annealingtemperatur unbekannt. Aus diesem Grund wurde auf einen Gradienten-Cycler zurückgegriffen, der die Möglichkeit bietet, während eines einzigen Laufes in unabhängigen identischen Proben verschiedene Annealingtemperaturen mit Differenzen von bis zu 15°C anzulegen. Es mußte angenommen werden, daß die Heterologität der Primer gegenüber ihrer Zielsequenz recht erheblich ist, so daß ein Annealingtemperatur-Spektrum von 48°C bis 63°C angelegt wurde. Hierbei sollten die ausgesprochen geringen Temperaturen gewährleisten, daß die degenerierten Primer auch bei verhältnismäßig schwacher Homologie zu *aba3* ihren Bindungspartner finden, auch unter Inkaufnahme von unspezifischen Bindungen und unerwünschten Nebenamplifikaten. Als DNA-Template für die RT-PCR dienten Aliquots einer zuvor revers-transkribierten mRNA aus Blättern von ca. 4 Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen des Ökotyps Columbia (Col-O). Der verwendete RT-Primer Poly-T<sub>(18)</sub>-BamHI sollte sicherstellen, daß nahezu alle synthetisierten Erststrang-cDNAs in voller Länge vorliegen.

Wie in Abbildung 2.8 zu sehen, erbrachte die RT-PCR unter den aufgeführten Bedingungen mit der Primerkombination ABA3.Deg.1+ und ABA3.Deg.2- mehrere Amplifikate, die jedoch bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen unterschiedlich intensiv auftreten. Da die im Gel bei ca. 800 bp auftretenden Bande ihre stärkste Intensität bei hohen Temperaturen erreicht, konnte angenommen werden, daß es sich hierbei um eine ausgesprochen spezifische Amplifikation handelte. Die Bande wurde daher aus dem Gel eluiert, in den Vektor pGEM-T Easy kloniert und sequenziert.



**Abb. 2.8: Ergebnis der RT-PCR mit den degenerierten Primern ABA3.Deg.1+ und ABA3.Deg.2- bei verschiedenen Annealingtemperaturen.** Auf dem 1%igen Agarosegel wurden jeweils 5 µl der RT-PCR Reaktion aufgetragen. Deutlich zu sehen ist, daß unspezifischere Banden bei höheren Annealingtemperaturen verschwinden, während eine ca. 800 bp-Bande intensiver wird.

In Versuchen mit der Primerkombination ABA3.Deg.1+ und ABA3.Deg.1- konnten hingegen unter keinen der getesteten Bedingungen Amplifikate erzielt werden.

### 2.2.2.1. Sequenzierung und Analyse des isolierten cDNA-Fragmentes

Bei der Sequenzierung des nach RT-PCR isolierten und klonierten Amplifikates stellte sich heraus, daß ein insgesamt 809 bp großes cDNA-Fragment, inclusive Primern, erhalten werden konnte. Von diesen beiden Primern bekannter Sequenz wurde ein 757 bp großes Fragment unbekannter Sequenz eingeschlossen, das nun einer genaueren Analyse unterzogen werden sollte. Wie die Abbildung 2.9 zeigt, repräsentiert das 757 bp-Fragment einen partiellen offenen Leseraster einer cDNA, die möglicherweise für das gesuchte ABA3-Protein kodiert.

Frame 2	R	N	D	A	A	K	L	L	K	K	T	Y	F	S	G	G	T	V
A	CGG	AAT	GAT	GCA	GCC	AAA	TTG	CTC	AAA	AAG	ACT	TAT	TTT	AGT	GGA	GGC	ACT	GTT
			10			19			28			37			46			55
A	A	S	I	A	D	I	D	F	V	K	R	R	E	R	V	E	E	F
GCT	GCT	TCA	ATT	GCT	GAC	ATC	GAC	TTT	GTA	AAA	AGA	AGG	GAA	AGG	GTG	GAG	GAG	TTT
		64			73			82			91			100			109	
E	D	G	S	A	S	F	L	S	I	A	A	I	R	H	G	F	K	L
GAG	GAT	GGT	TCT	GCT	TCA	TTC	CTG	AGC	ATA	GCA	GCC	ATC	CGT	CAT	GGC	TTC	AAA	TTA
		124			133			142			151			160			169	
K	S	L	T	P	S	A	I	W	M	H	T	T	S	L	S	I	Y	V
AAG	TCG	CTT	ACA	CCT	TCT	GCA	ATT	TGG	ATG	CAC	ACA	ACG	TCA	CTT	TCC	ATA	TAT	GTG
		184			193			202			211			220			229	
K	K	L	Q	A	L	R	H	G	N	G	A	A	V	C	V	L	Y	G
AAG	AAG	CTT	CAG	GCT	TTA	CGA	CAT	GGA	AAC	GGG	GCT	GCT	GTA	TGT	GTT	CTG	TAT	GGC
		244			253			262			271			280			289	
E	N	L	E	L	S	S	H	K	S	G	P	T	V	T	F	N	L	K
GAA	AAT	CTG	GAG	TTA	TCT	TCA	CAT	AAA	TCA	GGC	CCA	ACG	GTT	ACA	TTC	AAC	TTG	AAA
		304			313			322			331			340			349	
P	D	G	S	W	F	G	Y	L	E	V	E	K	L	A	S	L	S	G
CCT	GAT	GGC	TCT	TGG	TTT	GGC	TAC	TTG	GAG	GTG	GAG	AAG	CTT	GCT	TCT	TTA	TCT	GGA
		364			373			382			391			400			409	
Q	L	R	T	G	C	F	C	N	P	G	A	C	A	K	Y	L	E	L
CAG	TTA	CGG	ACA	GGA	TGT	TTT	TGC	AAT	CCT	GGC	GCA	TGT	GCA	AAG	TAT	CTC	GAG	TTA
		424			433			442			451			460			469	
H	S	E	L	R	S	N	V	E	A	G	H	I	C	W	D	D	N	D
CAT	TCT	GAG	CTA	CGG	TCT	AAT	GTA	GAG	GCT	GGG	CAT	ATT	TGC	TGG	GAT	GAC	AAT	GAT
		484			493			502			511			520			529	
I	N	G	K	P	T	G	A	V	R	V	S	F	G	Y	M	S	T	F
ATA	AAT	GGA	AAA	CCA	ACA	GGG	GCT	GTT	AGG	GTT	TCG	TTT	GGT	TAT	ATG	TCA	ACC	TTT
		544			553			562			571			580			589	

D	A	K	K	F	I	D	F	I	I	S	S	F	A	S	P	P	K	K	T
GAT	GCC	AAG	AAA	TTT	ATT	GAT	TTC	ATC	ATA	AGT	TCA	TTT	GCT	TCA	CCT	CCA	AAG	AAG	ACT
		604			613			622			631			640			649		
G	N	G	T	V	V	S	G	R	F	P	Q	L	P	S	E	D	L	E	S
GGG	AAT	GGA	ACC	GTC	GTC	AGT	GGA	AGG	TTT	CCT	CAA	CTT	CCT	AGT	GAA	GAC	CTT	GAA	AGT
		664			673			682			691			700			709		
K	E	S	F	P	S	H	Y	L	K	S	I	T	V						
AAA	GAA	TCT	TTT	CCA	AGC	CAC	TAC	CTT	AAG	TCA	ATT	ACT	GTA						
		724			733			742			751								

**Abb. 2.9: Nukleinsäure-Sequenz des isolierten cDNA-Fragmentes und die daraus resultierende Peptid-Sequenz des offenen Leserasters (Frame 2).** Von den möglichen sechs Leserastern kann lediglich der zweite, hier dargestellte, durchgängig translatiert werden.

Mit der aus dem offenen Leseraster resultierenden Peptid-Sequenz von 252 aa wurde sowohl in entsprechenden Datenbanken nach Homologien auf Protein-Ebene gesucht als auch ein Alignment mit bekannten putativen Moco-Sulfurasen aus Rind, *Aspergillus* und *Drosophila* durchgeführt (Abb. 2.10). Hierdurch konnte gezeigt werden, daß ausgeprägte Homologien zu den putativen Moco-Sulfurasen bestehen, weniger ausgeprägte aber auch zu anderen Proteinen. Ebenso konnte ein bisher nicht charakterisiertes Protein aus *Caenorhabditis elegans* den putativen Moco-Sulfurasen beigeordnet werden.

Arabidopsis	-RNDAAKLLKKTYFSGGTVAASIADIDFVKRRE--RVEEFFEDGSASFSLIAAIRHGFKL	57
Rind	-NNRLAALLRKTYFGGGTAAAYLAGDDFYVPRE--SVAERFEDGTISFLDVIALKHGFDA	57
Drosophila	-RRGAEVFQKRRFFGGGTINYAYPHAMDYQLR--ETFHQRYEDGTLPLFLSIVGLLEGFRT	57
Aspergillus	-KSSGDVFKHRKFFGGGTVDMLTDGNPWHAKKQSSIHQSLEDGTLPLFHSIIALDSAFET	60
C.elegans	-RKDSAHLIEKTSFAGGTQSVDEM SMFFVLR--EFERAFEEGTLNYYGIAQLQKGFEE	56
	. : .: *.*** : . . *:*: : .: : .*	
Arabidopsis	LKSLTP-----SAIWMHTTSLSIYVKKKLQALRHGNGAAVCVLYGS-ENLELSSHKS	108
Rind	LERLTGG-----MESIRQHTFTLAQYTYTALSSLRYPNGAPVVQIYSD-SDFS-SPEVQ	109
Drosophila	LERLVPRTDEFSTMERISRHVFLAKYLEDQLRQLHHPNGEPLVKLYN--KVGYQDKSRQ	115
Aspergillus	HGRLFR-----SMENVASHTRFLAKRLRDRMNALKHYNGSKVCQLYMSPNSSYDDASSQ	114
C.elegans	IERC GG-----ISSIRNLTHHLCKNALYMLKSKKHPNGRPVVEIYSQ-SEQFENPDKQ	108
	. : . *. : :: ** : :* . . .	
Arabidopsis	GPTVTFTNLKRPDGSWFGYLEVEKLASLSGIQLRTGCFNPGACAKYLELSHSELRSNVE-	167
Rind	GPVISFNVLDHGNVVGYSQVDKMASLHNIHVRTGCFNCTGACQRHLGISDEMVKKHLQ-	168
Drosophila	GGIVAFNVRTESGSFVGFGEIACVAALHGILLRTGCFNIGACQYYLGLDEDALDAIYKR	175
Aspergillus	GPILAFNLRNSRGMWIGKSEVERLASIKNIQIRSGTLCNPGGTALSLGWTGADMLRHS-	173
C.elegans	GPIVAFNLKRPDGGYYGYTEVEKMC AIFGIELRTGCFNIGACKKYLGITSEMIQENMS-	167
	* ::*: * * :: :.: . * :*: * * * : :	

Arabidopsis	AGHICWDDNDVINGKPTGAVRVSFSGYMSTFEDAKKFIDFIISFAS---	PPKKTGNGTVV	224
Rind	AGHVCDDVDLIDGQPTGSRISFGYMSLTEDAQAFLRFIIATRLH---	SSHGQPLPLAT	225
Drosophila	AGRICGDYFDLIDGQPTGAVRVSFSGYMTTIQDVKLLQMLRSSYLA---	TKPLQR-IQFI	231
Aspergillus	AGMRCGDDHDIMDERPTGILRISLGAMSSLTVDVTFIAFLEEFYVD---	KPPEGLPVPLT	230
C.elegans	KGKRCGDEIDLINGTPTGAIRISFGRTSTEHDITALEQMIDTCFTEGEHQAQSKPDPMNI		227
	* * * *::: *** :*:~* :~ * :~ :		
Arabidopsis	SGRFPQLPSEDLESKESFSPSHYLSITV----		252
Rind	PG-EAGAPPEDSEAQNAMPAARARGSSSP---		253
Drosophila	EEQAEQLPPLLKERVQLLRPKLLQMAIYP---		260
Aspergillus	GNVSLHQPSFYVESLSVYPIKSCGAFRIPDG-		261
C.elegans	ESYSPTVVNLFSFPIKSVGSVGRKRYELTARG		259

**Abb. 2.10: Alignment des 252 aa großen Peptides aus *Arabidopsis thaliana* gegen putative Moco-Sulfurasen anderer Organismen.** Rind = *Bos taurus* MCSU, GenBank Accession AB036422; *Drosophila melanogaster* Maroon-like, GenBank Accession AF162681; *Aspergillus nidulans* HxB, GenBank Accession AF128114; *Caenorhabditis elegans* putatives Protein, GenBank Accession CAA93672). (\*) kennzeichnet identische Positionen, (:) stark konservierte und (.) schwach konservierte Regionen.

Da die Homologien des aus der isolierten cDNA resultierenden Peptides zu anderen putativen Moco-Sulfurasen signifikant sind, wurde mit dem cDNA-Fragment in *Arabidopsis*-Datenbanken nach Homologien auf Nukleinsäure-Ebene gesucht. Auf diese Weise wurde der genomische BAC-Klon AC011808/F19K19 gefunden, auf dem das 757 bp-Fragment bereits 8 Exons zwischen den Positionen 76832 und 74828 des insgesamt 93485 bp großen Klones abzudecken schien. Mit Hilfe von Exon/Intron-Struktur-Programmen (ORNL Grail ([compbio.ornl.gov/Grail-1.3/](http://compbio.ornl.gov/Grail-1.3/)); GenScan ([genes.mit.edu/GS/](http://genes.mit.edu/GS/))) wurde daraufhin die Region um die angegebenen Positionen herum analysiert, um erste Informationen über voraussichtliche Größe der „full-length“ cDNA und Position von Translationsstart und Translationsstop zu erhalten. Ein an beiden Enden durch eine ClaI-Restriktions-Site begrenztes 8526 bp großes Fragment (Positionen 72137 bis 80662 in F19K19) beinhaltet demnach das gesamte gesuchte putative *aba3*-Gen (Tab. 2.2). Von besonderer Bedeutung waren hier die in der Tabelle 2.2 unter den Punkten 2.01 und 2.15 aufgeführten Informationen über die möglichen Initiations- und Terminations-Stellen der Translation. Die Angaben dazu deckten sich in den Ergebnissen der verschiedenen verwendeten Programme und wurden daher benutzt, um spezifische Primer gegen die flankierenden untranslatierten Bereiche herzustellen.

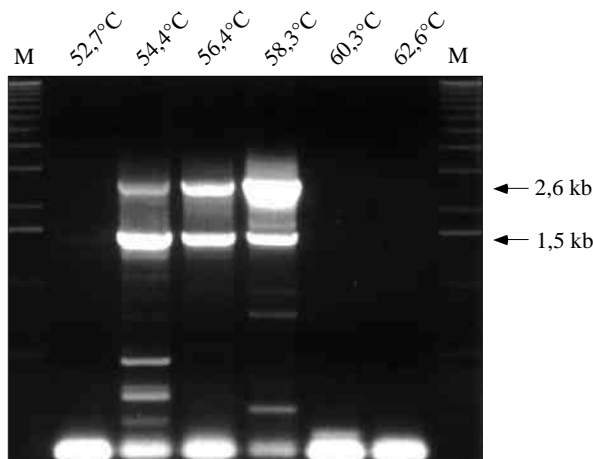
**Tab. 2.2:** Ergebnis der GenScan-Exon/Intron Analyse.

Gn.Ex : gene number, exon number (for reference)  
 Type : Init = Initial exon (ATG to 5' splice site)  
       Intr = Internal exon (3' splice site to 5' splice site)  
       Term = Terminal exon (3' splice site to stop codon)  
       Prom = Promoter (TATA box / initiation site)  
       PlyA = poly-A signal (consensus: AATAAA)  
 S : DNA strand (+ = input strand; - = opposite strand)  
 Begin : beginning of exon or signal (numbered on input strand)  
 End : end point of exon or signal (numbered on input strand)  
 Len : length of exon or signal (bp)  
 Fr : reading  
 Ph : net phase of exon (exon length modulo 3)  
 I/Ac : initiation signal or 3' splice site score  
 Do/T : 5' splice site or termination signal score  
 CodRg : coding region score  
 P : probability of exon (sum over all parses containing exon)  
 Tscr : exon score (depends on length, I/Ac, Do/T + CodRg scores)

Predicted genes/exons:

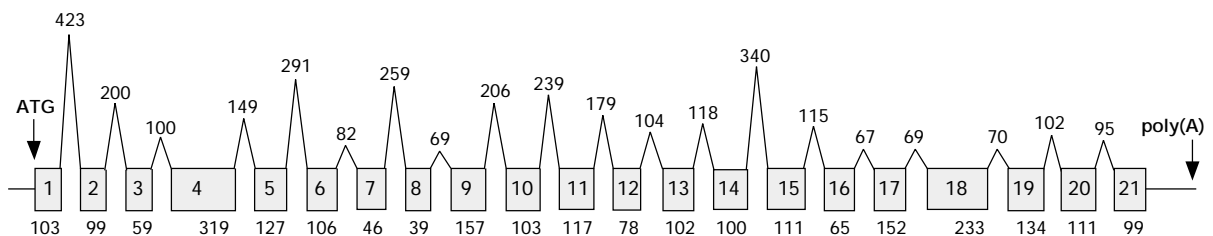
Gn.Ex	Type	S	.Begin	...End	.Len	Fr	Ph	I/Ac	Do/T	CodRg	P....	Tscr..
1.01	Init	-	900	35	866	0	2	58	-6	1028	0.359	89.50
1.00	Prom	-	1232	1193	40							-13.11
2.16	PlyA	-	1283	1278	6							1.05
2.15	Term	-	1420	1322	99	1	0	54	38	97	0.992	3.45
2.14	Intr	-	1862	1729	134	0	2	43	98	87	0.999	9.64
2.13	Intr	-	2165	1933	233	1	2	76	70	189	0.596	17.39
2.12	Intr	-	2386	2235	152	1	2	44	24	108	0.594	3.04
2.11	Intr	-	2518	2454	65	2	2	3	85	70	0.981	0.72
2.10	Intr	-	2744	2634	111	0	0	101	68	16	0.971	5.33
2.09	Intr	-	3184	3085	100	1	1	75	75	69	0.972	8.06
2.08	Intr	-	3404	3303	102	2	0	82	71	35	0.851	5.65
2.07	Intr	-	3882	3766	117	0	0	90	79	107	0.998	14.74
2.06	Intr	-	4224	4122	103	2	1	43	78	95	0.996	8.26
2.05	Intr	-	4639	4431	209	1	2	-6	76	160	0.315	7.35
2.04	Intr	-	5188	5083	106	0	1	22	65	94	0.579	4.80
2.03	Intr	-	5606	5480	127	0	1	99	58	43	0.988	6.22
2.02	Intr	-	6043	5756	288	2	0	6	58	155	0.463	5.59
2.01	Intr	-	7097	6956	142	2	1	62	66	228	0.843	22.01

Eine mit diesen Primern in einem Annealingtemperatur-Gradienten durchgeführte RT-PCR auf mit Poly-T<sub>(18)</sub>-BamHI revers transkribierte Col-O mRNA erbrachte das in der Abbildung 2.11 dargestellte Ergebnis. Die beiden ca. 2,6 kb und 1,5 kb großen dominierenden Banden wurden daraufhin direkt in pGEM-T Easy kloniert und sequenziert. Die Analyse des 1,5 kb großen Fragmentes ergab keine Homologien zu anderen bekannten Sequenzen. Es muß daher angenommen werden, daß es sich dabei um die unspezifische Amplifikation einer RNA-Verunreinigung handelte.



**Abb. 2.11:** Ergebnis der RT-PCR mit den Primern AC011808.5'-UTR und AC011808.3'-UTR auf revers transkribierte Blatt-mRNA aus *Arabidopsis* Col-O. Die verwendeten Annealingtemperaturen sind über den Spuren, in denen jeweils 10 µl der PCR-Reaktion aufgetragen wurden, angegeben.

Für das andere, genau 2630 bp große Amplifikat konnte hingegen gezeigt werden, daß es sich hierbei um die auf der Grundlage des genomischen Klones F19K19/AC011808 spezifisch amplifizierte putative *aba3*-cDNA handelte. Diese enthält einen offenen Leseraster von 2457 bp (ohne TAA-Stopcodon), bestehend aus 21 Exons mit einer durchschnittlichen Größe von 117 bp (Abb. 2.12), wodurch ein Protein von 819 aa kodiert würde.



**Abb. 2.12:** Anhand der isolierten 2630 bp großen cDNA ermittelte Exon/Intron-Struktur des korrespondierenden genomischen Bereiches. Exons sind als graue Boxen dargestellt, welche durch die Introns überbrückt werden. Der abgebildete Bereich erstreckt sich über ca. 6 kb.

Das gesamte Gen erstreckt sich von der ersten Position des Startcodons bis zur letzten Position des Stopcodons über insgesamt 5737 bp mit einer durchschnittlichen Introngröße von 164 bp. Bezogen auf den stets als genomische Referenz herangezogenen BAC-Klon F19K19 entspricht dies den Nukleotidpositionen 79194 (ATG) und 73458 (TAA). Die genauen Positionen und

Sequenzen der Exon-Intron Übergänge sowie die Größen von Exons und Introns sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

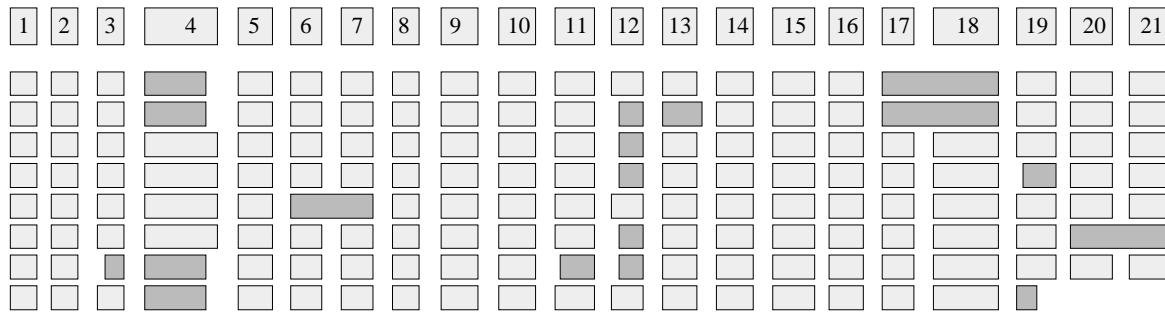
**Tab. 2.3: Exon-Intron Übergänge des putativen *aba3*-Gens.** Angegeben sind neben den Größen der Exons und Introns auch die Positionen der Exons innerhalb der cDNA sowie die Sequenzen der Splice-Akzeptorseiten (Intron-Exon Übergang) und Spleiß-Donorseiten (Exon-Intron Übergang). Intron-Sequenzen sind dabei in kleinen, Exon-Sequenzen in großen Buchstaben dargestellt.

	Exon [bp]	Intron [bp]	cDNA Position	Spleiß-Akzeptor	Spleiß-Donor
1	103	423	51-153	5'UTR - ATGGAAGCAT	TTAGATAAAGgtctgttttt
2	99	200	154-252	gtatgtgcagGTGTTGTATA	GGAAATCCACgtatcctcat
3	59	100	253-311	agtgatttagATAGTCAAAG	TCGACATCAGgtaccacatt
4	319	149	312-630	ctggagtttagGTGCTTGAAT	GAGTCAAGAGgtctgttagc
5	127	291	631-757	atgtttacagGAAATGCCTA	CCTTTAGCAAgtaggtttca
6	106	82	758-863	tttttataagGAGCAAGCGG	ATTCTACAAGgtatctcctg
7	46	259	864-909	tgtcatgaagTTATTTGGTT	GTACGGAATGgtgcgtaa
8	39	69	910-948	taatctacagATGCAGCCAA	TTTAGTGGAGgtatgcatct
9	157	206	949-1105	atacttacagGCACTGTTGC	CAATTTGGATgtgagtaaaa
10	103	239	1106-1208	tatttactagGCACACAACG	AAATCTGGAGgtcagttctt
11	117	179	1209-1325	tatgtttcagTTATCTTCAC	TCAGTTACGGgtatgttttg
12	78	104	1326-1403	tttggtgtagACAGGATGTT	TAATGTAGAGgtataattgt
13	102	118	1404-1505	tttaacacagGCTGGGCATA	AGATGCCAAGgtatatgtag
14	100	340	1506-1605	tcattcacagAAATTTATTG	CCTAGTGAAGgtacttgctc
15	111	115	1606-1716	tgatttgcagACCTTGAAAG	TGCAGAACAGgtatttcatt
16	65	67	1717-1781	aacataaaaagGCCTGCTGCA	CCAAAAGAAGgtaatagagc
17	152	69	1782-1933	tggcttctagGTGCCTGAGA	ATGCCAACATgtatgcattg
18	233	70	1934-2166	ttggttgcagACTTGAAAAC	TTAGAAGCAAgtaggtttcc
19	134	102	2167-2300	ttggttgcagAAGACGAGGA	TCATTTCACAgtaagtccat
20	111	95	2301-2411	ttcaatgcagTCATTGGGCG	GAGAGTAAAGgttcaacatt
21	99		2412-2510	ttggattcagGGAAAGATCT	TATTGAATAA - 3'UTR
	2460	3277			

Während die durchschnittliche Größe der Introns als normal anzusehen ist, ist im Vergleich zu anderen *Arabidopsis*-Genen die der Exons auffällig klein. Auch die hohe Zahl der Exons fällt auf und ist für *Arabidopsis* bei einem Gen dieser Größe eher untypisch.

#### 2.2.2.2. Spleiß-Variationen der *aba3*-cDNA

Neben der zuvor beschriebenen 2630 bp großen cDNA mit einem durchgängigen offenen Leseraster von 2457 bp wurden auch cDNAs anderer Größen isoliert, deren offene Leseraster durch Spleiß-Variationen verschiedener Art verkürzt sind (Abb. 2.13). Dies würde bedeuten, daß im Falle einer Translation stets auch trunkierte Proteine gebildet würden.



**Abb. 2.13: Schematische Darstellung einiger gefundener Spleiß-Variationen des *aba3*-Transkriptes.** Die Boxen der oberen Reihe repräsentieren die korrekt gespleißte cDNA mit ihren 21 Exons. In den Reihen darunter sind einige gefundene, unkorrekt gespleißte cDNAs dargestellt. Die jeweiligen alternativen Spleiß-Ereignisse an den Exons dieser cDNAs sind durch dunklere Boxen angedeutet, die gegenüber der korrekt gespleißten cDNA entweder verkürzt, verlängert oder miteinander verbunden sind.

Alle diese cDNAs wurden aber dennoch korrekt nach der GT/AG-Regel gespleißt und wiesen in der Regel sogar mindestens zwei alternative Spleiß-Ereignisse auf. Diese traten zudem an sogenannten „hot spot“-Regionen wie den Exons Nr. 4 und Nr. 12 in Form von Verkürzungen der entsprechenden Exons besonders häufig auf. Eine andere auftretende alternative Spleiß-Form ist das nichtkonsequente Spleißen, d. h. zwei Exons werden durch fehlendes Herausspleißen des dazwischenliegenden Introns miteinander verknüpft. In einem weiteren Fall kommt es sogar zum vollständigen Verlust der letzten zwei Exons, wodurch die resultierende cDNA insgesamt erheblich trunkiert wird. Neben den in der Abbildung 2.13 dargestellten Spleiß-Variationen wurden aber auch Deletionen innerhalb des 3'-untranslatierten Bereiches gefunden. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß ca. 1/4 aller cDNAs korrektes Spleißen aufwiesen und ca. 3/4 aller cDNAs verschiedenste Spleiß-Variationen darstellten.

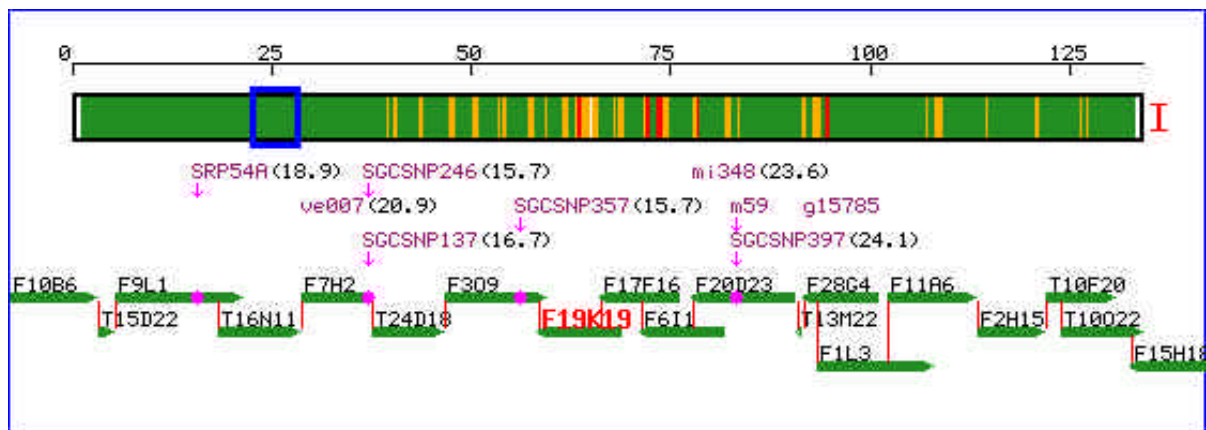
### 2.2.3. Genomische Charakterisierung von *aba3*

Zur Charakterisierung eines neuen Gens gehört neben der Analyse der cDNA auch die Aufklärung der genomischen Organisation. Dies beinhaltet die Lokalisierung des Genlocus, die Ermittlung der Kopienzahl des Gens, die Untersuchung der Promotorregion auf regulatorische Elemente und die Analyse der genomischen Umgebung des Gens. Da mittlerweile die kompletten Sequenzen aller fünf Chromosomen von *Arabidopsis* vorliegen, soll zusätzlich auch nach Duplikationen von Abschnitten des *aba3*-Gens an anderen Loci gesucht werden.



### 2.2.3.1. Lokalisierung von *aba3*

Den Kartierungsdaten von Leon-Kloosterziel *et al.* (1996) nach sollte das gesuchte *aba3*-Gen auf Chromosom 1 bei ca. 14 cM in unmittelbarer Nähe zu den genomischen Markern *alb1* und *dis1* lokalisiert sein. Um diese Angabe zu überprüfen, wurde der genomische Klon F19K19 mit den bereits zugeordneten Markern und Klonen in den Datenbanken des *Arabidopsis*-Genom-Projektes verglichen. Hierbei werden Sequenzen neuer Klone auf überlappende Bereiche zu bereits kartierten Klonen hin untersucht. Die Abbildung 2.14 zeigt, daß dem Klon F19K19 somit tatsächlich eine Position auf Chromosom 1 zugeordnet werden konnte.

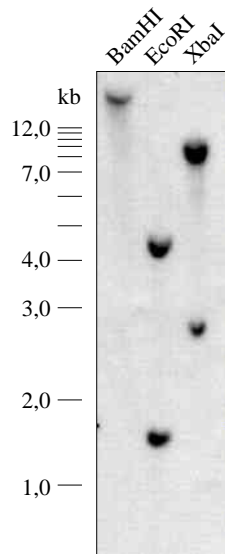


**Abb. 2.14: Computergestützte Kartierung des Klonen F19K19 auf Chromosom 1.** Der obere farbige Balken repräsentiert das gesamte Chromosom 1, die darunter abgebildeten grünen Balken die einzelnen genomischen Klone aus dem blau gerahmten Ausschnitt auf Chromosom 1. Pinkfarben dargestellt sind die in dieser Region sich befindenden genomischen Marker.

Flankiert von den angrenzenden Klonen F309 und F17F16 kann mit Hilfe des Markers SGCSNP357 bei 15,7 cM für F19K19 eine Position bei ca. 17 cM angenommen werden. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß es sich hierbei um den Vergleich elektronischer Daten und absoluter Größen von Klonen handelt, die zwangsläufig von den klassischen Daten der rekombinanten Rückkreuzungen abweichen. Ferner ist vor allem die detaillierte Auflösung in sehr kleinen genomischen Bereichen ungenau, wie unter anderem dem nicht-linearen Verlauf der Marker-Positionen in Abbildung 2.14 zu entnehmen ist. Beachtenswert ist jedoch die unmittelbare Nachbarschaft zum Klon F20D23 (AC007651), der das Cytochrom P450-homologe Gen enthält, welches in der Mutante *13.5* von der T-DNA Integration betroffen ist.

### 2.2.3.2. Southern-Analyse des *aba3*-Gens aus *Arabidopsis*

Nachdem die genomische Position des Klonen F19K19 bestätigt werden konnte, wurde in einer Southern-Analyse die Kopienzahl des *aba3*-Gens überprüft. Wie die Abbildung 2.15 zeigt, kann davon ausgegangen werden, daß *aba3* in einfacher Kopie im *Arabidopsis*-Genom vorliegt, d. h. einen „single-copy locus“ repräsentiert.



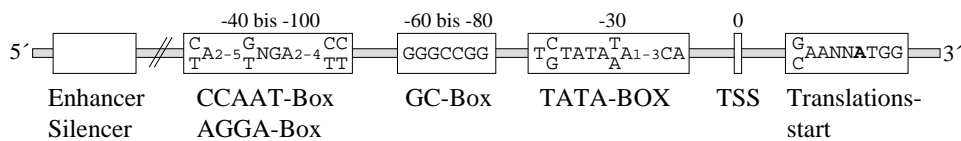
**Abb. 2.15: Southern-Analyse von genomischer *Arabidopsis*-DNA mit radioaktiv markierter full-length *aba3*-cDNA als Sonde.** BamHI verdaute DNA sollte ein Signal bei 18 kb geben, EcoRI verdaute DNA ein Signal bei ca. 4,5 kb und zwei sich überlagernde Signale bei ca. 1,6 kb, XbaI verdaute DNA zwei Signale bei 2,8 kb und 9,2 kb. Je 5 µg DNA wurden unter stringenten Bedingungen bei 62°C hybridisiert und gewaschen. Daß keine weiteren Banden als die erwarteten auftreten, deutet auf die Präsenz nur einer Genkopie hin.

### 2.2.3.3. Analyse des genomischen 5'-Bereiches von *aba3* auf Promotor-Elemente

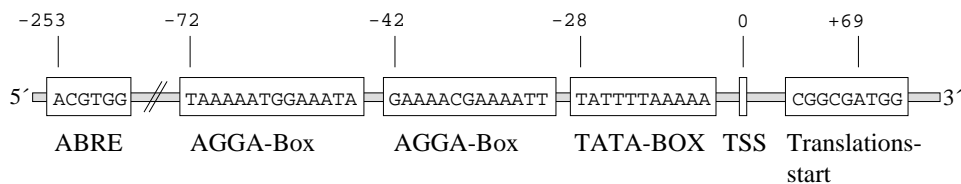
Da im Falle von *aba3* auf eine gezielte experimentelle Analyse des Promotors verzichtet wurde, sollte die datenbankgestützte Analyse der im 5'-Bereich des Gens gelegenen genomischen Bereiche Aufschluß über regulatorische Elemente liefern. Dabei stand die Suche nach den basalen Elementen eines pflanzlichen bzw. eukaryontischen Promotors wie die TATA-Box, CAAT- bzw. AGGA-Boxen und GC-Boxen im Vordergrund. Als Kriterien zur Bestimmung dieser Elemente dienten vorrangig Consensus-Sequenzen dieser Elemente sowie deren Positionierung innerhalb eukaryontischer Promotorregionen. Die Abbildung 2.16 zeigt eine mögliche Anordnung der basalen regulatorischen Elemente im putativen *aba3*-Promotor sowie ein durch ABA reguliertes Element (ABRE = ABA response element). Ein hypothetischer

Transkriptionsstart wurde in einer Entfernung von 69 bp stromaufwärts („upstream“) vom Translationsstartpunkt identifiziert. Eine mögliche TATA-Box an Position –28 in Relation zum Transkriptionsstart, der die Position 0 besitzt, sowie zwei mögliche AGGA-Boxen an den Positionen –42 und –72 runden das Bild eines pflanzlichen Promotors ab. Das Fehlen einer GC-Box ist für *Arabidopsis* nicht untypisch, da bei einem genomischen GC-Gehalt von nur ca. 37% GC-Cluster eher selten auftreten.

### Allgemeiner pflanzlicher Promotor



### *Arabidopsis aba3*-Promotor



**Abb. 2.16: Schematische Darstellung möglicher Promotorelemente von *aba3* im Vergleich zu Consensus-Sequenzen des allgemeinen pflanzlichen Promotors.** Die GC-Box ist nicht immer Bestandteil pflanzlicher Promotoren, hier aber der Vollständigkeit halber mit aufgeführt. (ABRE = ABscisic acid Response Element; TSS = Transkriptionsstart).

Eine Ausweitung der Suche nach weiteren regulatorischen Elementen auf der Basis von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen mit Hilfe des Programmes MatInspector V2.2 (<http://transfac.gbf.de/TRANSFAC/index.html>) über einen Bereich von 2000 bp vor dem Translationsstart erbrachte mögliche Bindungsstellen für 11 Transkriptionsfaktoren. Die Übereinstimmungen mit den Consensus-Sequenzen lagen dabei zwischen 99% und 85%. Die identifizierten Faktoren sind „Athb-1“ (*A. thaliana* homeobox protein 1), der vermutlich eine Rolle während der Embryonalentwicklung spielt, „GAmyb“ (giberelline regulated myb-gene), der die Gibberellin-induzierte Expression verschiedener Gene steuert, „Myb.PH3“ und „PO1“ mit aktivierenden Funktionen bei der Expression von Genen der Flavonoid-Synthese, „SBF1“ (silencer binding factor 1), der an Silencer-Elemente bindet und durch Phosphorylierung aktiviert werden muß, „bZIP910“, welcher einen Leucin-Zipper Faktor darstellt, „DOF1“,

„DOF2“ und „DOF3“, die allesamt lichtabhängige Zink-Finger Transkriptionsfaktoren mit z. T. aktivierender und z. T. reprimierender Funktion für verschiedenen Proteine darstellen, „PBF“, ein Prolamin-Box Bindungs-Faktor und „GBP“, ein G-box bindendes Protein. Wenn auch unter all diesen Faktoren keine signifikanten Funktionshomologien ausgemacht werden können, so deutet die große Anzahl doch auf eine starke Regulation des *aba3*-Gens hin. Besonders bemerkenswert ist dabei auch die Präsenz zweier Motive, die eigentlich im Widerspruch zueinander stehen, denn die gleichzeitige Regulation von *aba3* über das ABRE-Motiv und das GAmyb-Motiv durch die antagonistisch wirkenden Phytohormone ABA und Gibberellinsäure erscheint schwer einzuordnen.

#### 2.2.3.4. Genomische Umgebung von *aba3*

Ein weiterer Punkt der genomischen Charakterisierung von *aba3* beinhaltet die Analyse der unmittelbaren genomischen Umgebung des Gens. Dabei wurde wiederum auf den genomischen Klon F19K19 sowie auf den überlappenden Klon F3O9 (Abb. 2.14) zurückgegriffen, die zusammen alle das *aba3*-Gen unmittelbar flankierenden Bereiche enthalten. Die ersten fünf auf jeder Seite des *aba3*-Gens gelegenen Gene sind im Folgenden aufgelistet:

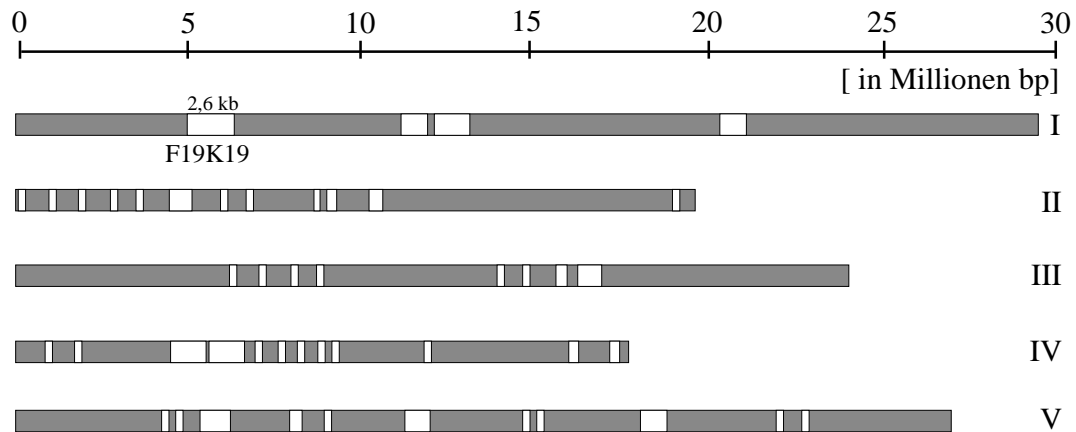
Auf dem Klon F19K19 konnte zunächst in unmittelbarer Nachbarschaft zum 3'-Bereich des *aba3*-Gens ein Gen für ein putatives Protein (AAG10825) ausgemacht werden, dem aufgrund seiner Primärsequenz eine Funktion als Zellteilungs-Kontrollprotein zugeordnet werden kann. In einer Entfernung von 0,5 kb schließt sich daran ein als putative Glycosyl-Transferase beschriebenes Gen (AAG10823) an, welches nach weiteren 0,4 kb seinerseits von einem Gen (AAG10822) flankiert wird, für das aufgrund seiner Homologien von 59% auf Proteinebene zu „mitotic checkpoint“ Proteinen aus *Homo sapiens* ebenfalls eine Rolle während der Zellteilung als wahrscheinlich scheint. Diesem folgt nach weiteren 1,3 kb ein putatives Gen für ein RNA-bindendes, als Splice-Faktor charakterisiertes Protein (AAG10821), dem sich nach 3,5 kb erneut ein Gen mit einer Funktion während der Zellteilung anschließt (AAG10820). Die Homologien zu dem Cohesin-Protein SMC1 aus *Xaenopus laevis* deuten an, daß dieses Protein die Kohäsion von Schwester-Chromatiden kontrolliert.

Im 5'-Bereich des *aba3*-Gens kommt es zum Überlapp der Klone F19K19 und F3O9. Letzterer wurde im Hinblick auf die den 5'-Bereich des *aba3*-Gens flankierenden Gene eingehender untersucht. Dabei wurde zunächst ein Gen identifiziert, dessen Protein (AAD34704)

Homologien von 60% zu einer Acetylglutamat-Kinase aus dem phytopathogenen Bakterium *Xylella fastidiosa* sowie von 44% zu dem „signal-transducer and transcription activator“ STAT5B aus *Homo sapiens* aufweist. In einem Abstand von nur 0,4 kb schließt sich daran ein Gen an, dessen Protein (AAD34703) Homologien von 57% zu Myosin H aus *Mus musculus* bzw. von 52% zu einem Heat shock-Transkriptionsfaktor-bindenden Protein aus *Homo sapiens* besitzt. Ein Gen (AAD34702) mit Homologien auf Proteinebene zu einem durch das Phytohormon Indoleessigsäure induzierten Protein aus *Vigna radiata* befindet sich weitere 3,7 kb entfernt. Im Anschluß daran folgt nach 4,7 kb ein putatives Gen für ein Protein (AAD34701) mit Homologien zu Membran-Rezeptoren aus *Drosophila melanogaster* und nach weiteren 8,2 kb ein Myb-Transkriptionsfaktor-verwandtes Gen (AAD34700) mit Homologien auf Proteinebene von 78% zu *Nicotiana plumbaginifolia* bzw. 87% zu *Oriza sativa*. Obwohl nicht für alle genannten Gene Expression gezeigt, d. h. Datenbank-ESTs gefunden werden konnten, fällt auf, daß es sich bei fast allen um solche handelt, die auf der einen Seite regulatorische Eigenschaften besitzen, auf der anderen Seite selbst reguliert werden. Dabei scheint auch ein Cluster von Genen darunter zu sein, die an der Zellteilung teilhaben bzw. diese kontrollieren. Darüber hinaus treten gehäuft (putative) Gene für Transkriptionsfaktoren auf, was auf eine für regulatorische Elemente gut zugängliche genomische Region hindeutet. Somit stellt sich die Frage, wie *aba3* selbst in diese Region paßt.

#### 2.2.3.5. Repetition von Bereichen des *aba3*-Gens

Während der detaillierten Analyse der genomischen Region um *aba3* wurde gefunden, daß nahezu die gesamte Promotorregion von *aba3* z. T. in einer Größe von 2,6 kb, z. T. in Form von trunkierten Teilfragmenten auf allen Chromosomen des *Arabidopsis*-Genoms redundant vorliegt (Abb. 2.17). Diese Fragmente befinden sich dabei stets innerhalb sogenannter „repeat regions“ oder „misc features“, welche niemals codierende Regionen betreffen und auch nur in wenigen Fällen in so enger Nachbarschaft zu Genen liegen, daß auch hier eine Promotor-Funktion angenommen werden könnte. Augenfällig ist ferner, daß sämtliche Repetitionen untereinander zu 92% bis 99% identisch sind. Inwiefern diese Repetitionen aus Duplikationsereignissen hervorgegangen sind und sich im Verlauf der Evolution Funktionen erhalten oder neue angeeignet haben, kann nur spekuliert werden. Repetitionen des *aba3*-Gens selbst wurden im Genom von *Arabidopsis* jedoch nicht gefunden.

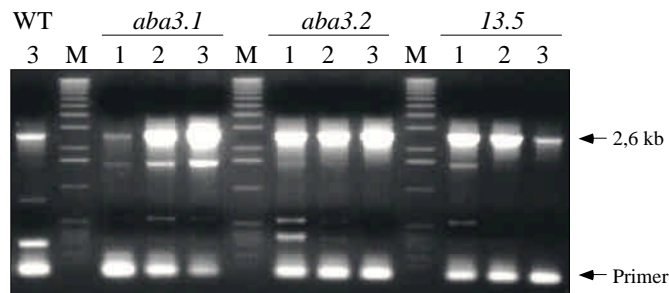


**Abb. 2.17: Duplikationen von Teilen des 2,6 kb großen Fragmentes aus dem Promotorbereich von *aba3*.** Grau sind die Chromosomen dargestellt, als weiße Kästen die duplizierten Bereiche. Die Größe der Kästen soll die Größenverhältnisse der Repetitionen widerspiegeln. Dargestellt sind nur mehr als 500 bp umfassende Repetitionen. Auch hier diente der das *aba3*-Gen enthaltende Klon F19K19 als Grundlage der Analysen.

#### 2.2.4. Molekulare Analyse der Mutanten *aba3.1*, *aba3.2* und 13.5

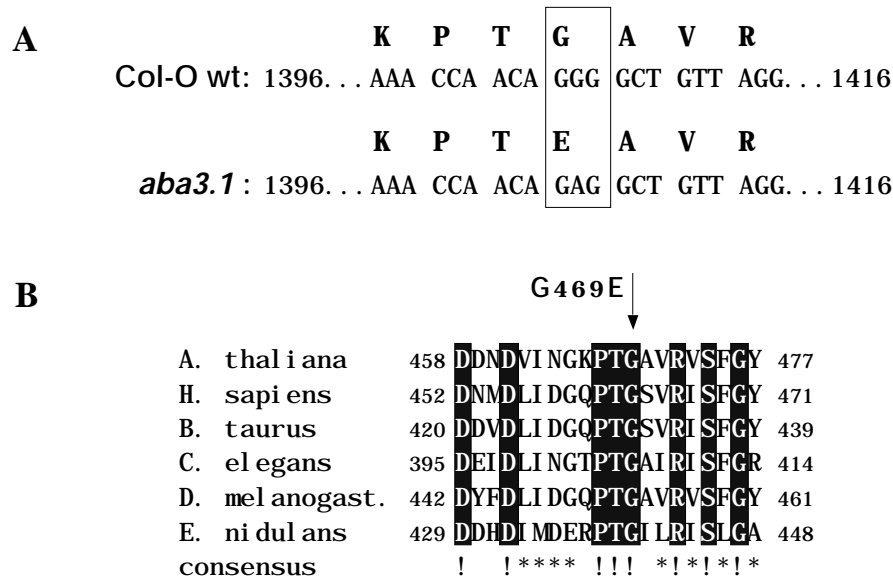
Nachdem die Mutanten biochemisch eingängig vorcharakterisiert wurden und die Sequenz des gesuchten *aba3*-Gens vorlag, sollte die Analyse der Mutanten durch Klonierung und Sequenzierung der *aba3*-Allele abgerundet werden. Dies sollte endgültigen Aufschluß darüber geben, ob es sich wirklich um Mutanten des *aba3*-Locus handelt. Hierbei war es notwendig, die Untersuchungen auf cDNA- und genomischer Ebene durchzuführen.

In einem ersten Schritt der molekularen Charakterisierung der Mutanten wurde eine RT-PCR mit Primern gegen die untranslatierten 5'- und 3'-Bereiche des Transkriptes durchgeführt, um zu überprüfen, ob es überhaupt zu einer Expression der Gene kommt. In der Abbildung 2.18 ist zu sehen, daß die Transkription des *aba3*-Gens in allen Mutanten weiterhin stattfindet. Unterschiede in der Signalstärke der in Abbildung 2.18 gezeigten RT-PCR Resultate ergeben sich aus Ökotyp-spezifischen Sequenzunterschieden, die die Primerbindung beeinflussen.



**Abb. 2.18:** Ergebnis der RT-PCR mit den Primern AC011808.5'-UTR und AC011808.3'-UTR auf revers transkribierte Blatt-mRNA aus den *Arabidopsis*-Mutanten *aba3.1*, *aba3.2* und *13.5*. Als Kontrolle wurde gleichermaßen eine Reaktion mit gesamt RNA aus dem Wildtyp Col-O durchgeführt. Die verwendeten Annealingtemperaturen waren (1) 54,4°C, (2) 56,4°C und (3) 58,3°C. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der RT-PCR-Reaktion.

Zur Analyse der Mutanten-Allele wurden die generierten cDNAs in den Vektor pGEM-T Easy kloniert und daraufhin jeweils mindestens fünf voneinander unabhängige Klone sequenziert. Da jede Mutante einen anderen Wildtyp-Hintergrund besitzt, mußten neben dem Ökotyp Columbia (Col-O) als Referenz für die Mutante *aba3.1* auch die Ökotypen Landsberg erecta (Le) und Wassilewskija (Ws) als Referenzen für die Mutanten *aba3.2* bzw. *13.5* analysiert werden. Nach Vergleich der cDNA-Sequenzen von *aba3.1*-Mutante und Wildtyp Col-O konnte eine G A Substitution an der cDNA-Position 1406, ausgehend vom Start-ATG, identifiziert werden. Dies wiederum führt zu einem Aminosäure-Austausch von Glycin zu Glutaminsäure an Position 469 innerhalb einer unter allen Moco-Sulfurasen hochkonservierten Region des Proteins (Abb. 2.19). Durch Sequenzierung eines PCR-Fragmentes des entsprechenden genomischen Abschnittes konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Für die Mutanten *aba3.2* und *13.5* wurden deutlich komplexere Mutationen gefunden



**Abb. 2.19: Mutation in der Mutante *aba3.1* aus *Arabidopsis*.** (A) zeigt die betroffene cDNA-Region von Wildtyp und Mutante sowie die entsprechenden Aminosäure-Sequenzen mit dem Austausch von Glycin (G) zu Glutaminsäure (E). (B) zeigt ein Protein-Alignment der von der Mutation betroffenen Region bekannter putativer Moco-Sulfurasen. Vor der ersten und hinter der letzten Aminosäure sind die Positionen innerhalb des jeweiligen Proteins angegeben. Auch die erst seit kurzem verfügbare Sequenz der humanen putativen Moco-Sulfurase HMCS ist berücksichtigt. (! = identische Positionen; \* = konservierte Positionen)

In beiden Fällen sind Spleiß-Stellen betroffen, wodurch unkorrekt gespleißte Transkripte entstehen, deren ehemals durchgängige offene Leseraster vorzeitig unterbrochen werden. So konnte in der *aba3.2*-Mutante eine G → A Substitution in der Spleiß-Akzeptor-Stelle zwischen Intron 10 und Exon 11 identifiziert werden, wodurch es 19 bp stromabwärts zur Nutzung einer alternativen Spleiß-Stelle innerhalb des Exons 11 kommt (Abb. 2.20 A). Die daraus resultierende Verkürzung des Exons 11 führt zu einer Leseraster-Verschiebung und weitere 22 bp stromabwärts von der alternativen Spleiß-Stelle zum Translationsabbruch. Ein eventuell noch gebildetes Protein wäre dann von 819 aa auf 393 aa trunziert. Zwei weitere Mutationen in Form einer T-Deletion und eines T → A Austausches innerhalb der vier Basen stromabwärts der ersten Mutation haben keinen Effekt, da sie mit dem Intron 10 herausgespleißt werden.

Für die Mutante *13.5* konnte gezeigt werden, daß durch eine Deletion von 39 bp auch die Spleiß-Donor-Stelle des Introns 4 eliminiert wurde (Abb. 2.20.B). Hierdurch kommt es 61 bp stromaufwärts der ursprünglichen Spleiß-Stelle zu alternativem Spleißen innerhalb des vorangehenden Exons 4 mit der Folge einer Leseraster-Verschiebung. Im Falle einer Translation des *13.5*-Transkriptes käme es somit 52 bp stromabwärts der alternativen Spleiß-Stelle zu einem Abbruch der Translation und das resultierende Protein würde auf 190 aa verkürzt werden.



**A**

	Intron #10	Exon #11
<b>Le genom.</b>	ttt tatgtttcag	TTATCTTCAC ATAAATCAGG CCCAACGGTT ACATTCAACT ...
<b>Le mRNA.</b>	...	TTATCTTCAC ATAAATCAGG CCCAACGGTT ACATTCAACT ...
<b>aba3.2 genom.</b>	ttt tatgtttcaa	-taacttcac ataaatcagG CCCAACGGTT ACATTCAACT ...
<b>aba3.2 mRNA.</b>	...	... G CCCAACGGTT ACATTCAACT ...
	↑ Splice-Akzeptor Wildtyp	↑ Splice-Akzeptor <i>aba3.2</i>

**B**

<b>WS genom.</b>	... TCAGGACCAT CTATCAAGGT AAAGCATCGT GCTGTGCAGA TGAGAAACAC TTCTAAACTC CAAAAGGAAG AGTCAAGAG tctgttagct tgata....
	Splice-Donor Wildtyp (Exon #4 / Intron #4)
	Splice-Donor 13.5
<b>13.5 genom.</b>	... TCAGGACCAT CTATCAAGgt aaagcatcgt gctgtgcaga tgagaaacac tt — 39 bp Deletion incl. Splice-Donor — gata....
<b>WS mRNA</b>	... TCAGGACCAT CTATCAAGGT AAAGCATCGT GCTGTGCAGA TGAGAAACAC TTCTAAACTC CAAAAGGAAG AGTCAAGAG (Ende Exon #4)...
<b>13.5 mRNA</b>	... TCAGGACCAT CTATCAAG (Ende Exon #4)...

**Abb. 2.20: Mutationen der Mutanten *aba3.2* und *13.5*.** In (A) sind die die Mutationen enthaltenden genomischen und cDNA-Regionen der Mutante *aba3.2* im Vergleich zum Wildtyp Le dargestellt. Die relevante Mutation ist eingerahmt, die im Wildtyp bzw. in der Mutante benutzte Spleiß-Stelle ist schwarz unterlegt. (B) zeigt die Mutation-enthaltende Region der *13.5*-Mutante auf genomischer Ebene und die daraus resultierende Verkürzung des Exons 4 um 61 bp im Vergleich zum Wildtyp Ws. Auch hier ist die relevante Mutation eingerahmt und die im Wildtyp bzw. in der Mutante benutzte Spleiß-Stelle schwarz unterlegt. Intronsequenzen sind sowohl in (A) als auch in (B) klein, Exonsequenzen groß geschrieben.

### 2.3. Funktionelle Komplementation der *Arabidopsis*-Mutanten *aba3.1* und *aba3.2*

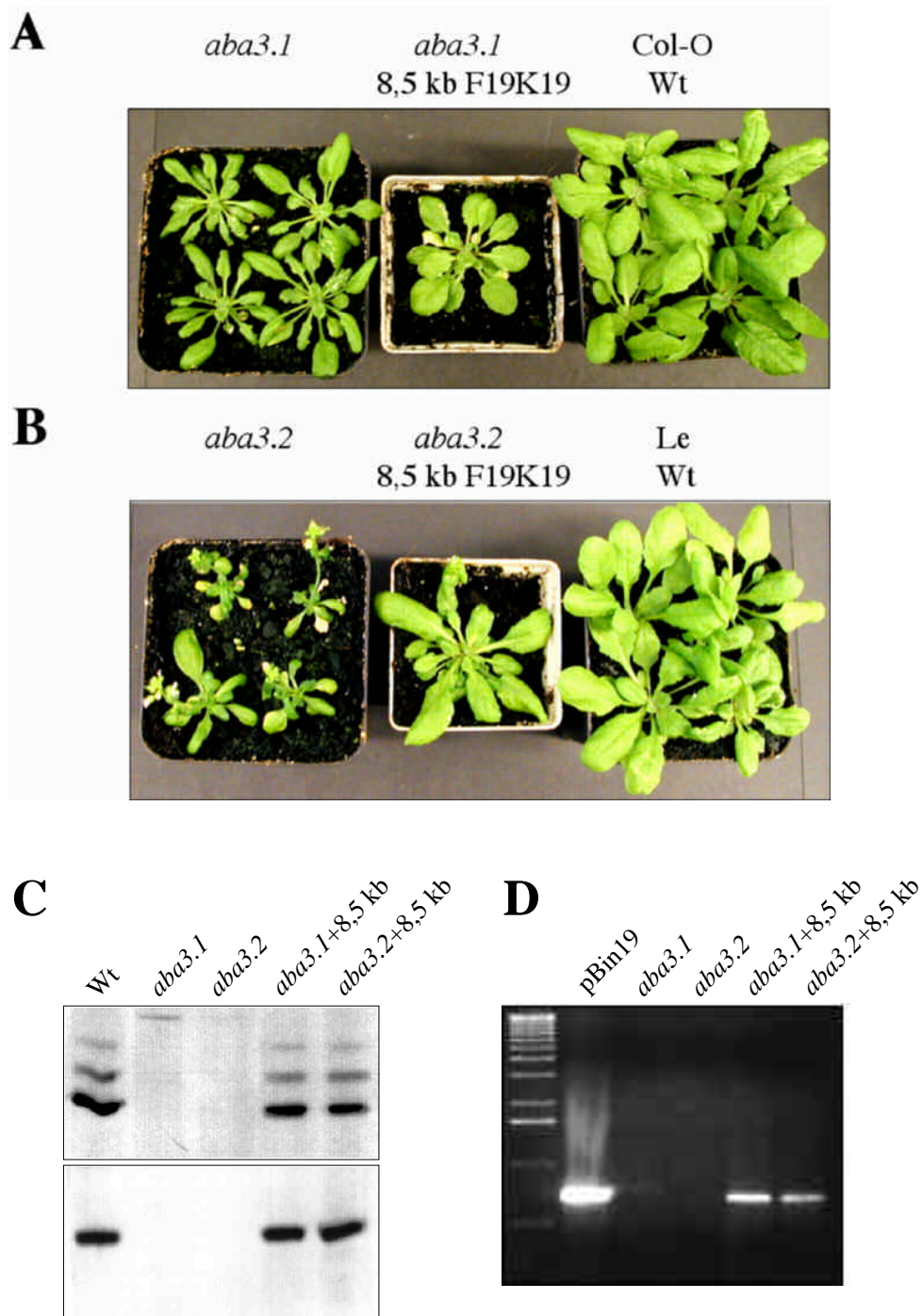
Um die Funktionalität eines isolierten Gens zu überprüfen, können entsprechende Mutanten, sofern vorhanden, mit der cDNA oder dem gesamten Gen transformiert werden. Im Idealfall kann dadurch ein starker Mutanten-Phänotyp zum Wildtyp-Phänotyp revertiert werden, d. h. die transgene Pflanze erhält durch die Expression des eingebrachten Gens ihre mutationsbedingt verlorenen Funktionen zurück. Wenn das eingebrachte Gen und das auf dem mutierten Locus

kodierte Gen identisch sind, kann eine solche „homologe“ Komplementation als Beweis für die Funktionalität des entsprechenden Gens angesehen werden. Darüberhinaus wird dadurch bewiesen, daß der Mutanten-Phänotyp allein aus dieser Mutation heraus entstanden ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zuvor charakterisierten Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* für solche homologen Komplementations-Versuche herangezogen. Von der Mutante *13.5* wurde abgesehen, da diese durch die Integration der T-DNA aus pGKB5 bereits kanamycinresistent ist. Dies würde die Selektion von transgenen Nachkommen unmöglich machen, da alle für diese Arbeit zur Verfügung stehenden und für *Arabidopsis* geeigneten T-DNA Binärvektoren ebenfalls nur die Selektion auf Kanamycin erlauben. Da außerdem bereits zwei betroffene Gen-Loci identifiziert wurden und weitere aufgrund der Natur der Mutation nicht ausgeschlossen werden konnten, erschien dies auch im Hinblick auf spätere physiologische Analysen nicht sinnvoll.

Für die Durchführung der Komplementations-Versuche wurden zwei verschiedene Konstrukte verwendet. Zum einen wurde die *aba3*-cDNA in dem Vektor pGA643 unter Kontrolle des starken und konstitutiven 35S-CaMV-Promotors (Gardner *et al.*, 1981; Covey *et al.*, 1981) in die Pflanzen eingebracht, zum anderen diente ein 8526 bp großes ClaI-Fragment des genomischen Klonen F19K19 in dem Binärvektor pBin19 zur Transformation der Mutanten. Auf diesem Fragment ist das gesamte *aba3*-Gen von 5,7 kb mit ca. 1,5 kb der vermutlich den Basal-Promotor enthaltenden 5'-Region sowie ca. 1,3 kb der 3'-Region enthalten. Bei diesem Konstrukt wurde auf einen Fremd-Promotor verzichtet, um quasi "nebenbei" eine erste experimentelle Promotoranalyse durchführen zu können. Die Transformation selbst wurde entsprechend der nach Bechthold *et al.* (1993) modifizierten Agrobakterien-vermittelten Vakuuminfiltrations-Methode durchgeführt.

Die Abbildungen 2.21 (A) und (B) zeigen das Ergebnis der Transformation der Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* mit dem genomischen 8,5 kb-Fragment. Exemplarisch ist hier je ein Beispiel einer transgenen Linie von *aba3.1* und *aba3.2* in Erdkultur nach *in vitro*-Selektion mit Kanamycin dargestellt. Die Abbildungen 2.21 (C) und (D) zeigen die Rekonstitution der Aktivitäten von AO und XDH in den transgenen Linien bzw. den PCR-Nachweis des bei der Transformation mitübertragenen Kanamycin-Fremdgens. Es wird deutlich, daß die Rekonstitution bereits visuell erfaßt werden kann. Mit dem 8,5 kb-Fragment transformierte Mutanten zeigen klar eine äußerlich sichtbare Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps. Dies äußert sich auch in den Ergebnissen der AO- und XDH-Aktivitätstests, in denen nahezu die Aktivitäten des Wildtyps erreicht werden.



**Abb. 2.21: Komplementation der Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* durch das genomische 8,5 kb-Fragment aus F19K19.** Rekonstitution des Habitus von *aba3.1* (A) und *aba3.2* (B). (C) zeigt die Wiederherstellung der Aktivitäten von AO und XDH in den beiden Mutanten. In (D) ist das Ergebnis der PCR zum Nachweis des mittransformierten Kanamycinresistenz-Gens dargestellt. Als Positivkontrolle diente hier der Binärvektor pBin19, der auch zur Transformation verwendet wurde und das Kan<sup>R</sup>-Gen trägt. Die Negativkontrollen werden durch die untransformierten Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* gestellt.

Die Transformation der Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* mit der *aba3*-cDNA unter Kontrolle des starken 35S-Promotors brachte jedoch keine lebensfähigen Transformanten hervor. Zwar selektierten einige Jungpflanzen unter allen auf Kanamycin ausplattierten Samen heraus, jedoch starben auch diese nach wenigen weiteren Tagen stets ab.

## **2.4. Biochemische Charakterisierung des ABA3-Proteins**

Nach der Isolierung und Klonierung der cDNA eines neuen Gens schließt sich üblicherweise eine erste Charakterisierung des kodierten Proteins an. Hierzu muß zunächst rekombinantes Protein in einem pro- oder eukaryontischen Expressions-System angereichert werden bevor es nach Abtrennung der restlichen Proteine des Systems für die eigentliche biochemische Charakterisierung herangezogen werden kann. Im günstigsten Fall stehen hierzu Assays zur Verfügung, die eine eindeutige Zuordnung einer oder mehrerer Funktionen dieses Proteins erlauben. Um eine solche Charakterisierung von vorn herein auf eine begrenzte Anzahl möglichst sinnvoller Versuche zu beschränken, kann man mit Hilfe geeigneter Computer-Programme mögliche Funktionen und Eigenschaften anhand der Primärsequenz des Proteins erkennen. Hierbei dient der Vergleich mit Primärsequenzen anderer, funktionell bereits beschriebener Proteine, als Basis für die Vorcharakterisierung eines neuen Proteins. Letztlich dürfen die hierdurch gewonnenen Erkenntnisse aber nur als Hinweise dienen und müssen experimentell untersucht werden, bevor sie auf das native Protein und seine *in vivo*-Funktion übertragen werden können.

### **2.4.1. Analyse der Primärsequenz der putativen Moco-Sulfurase ABA3 aus *Arabidopsis thaliana***

In einer ersten Charakterisierung des ABA3-Proteins wurde dessen Primärsequenz mit den Sequenzen anderer putativer Moco-Sulfurasen aus anderen Organismen verglichen. Solche Alignments dienen zum einen dazu, den Grad der Homologien und Verwandtschaften unter den Proteinen einer Klasse zu ermitteln, zum anderen helfen sie, besonders konservierte und somit funktionell eventuell essentielle Bereiche dieser Proteine zu identifizieren. Die Abbildung 2.22 zeigt ein Alignment aller putativen Moco-Sulfurasen, für die bereits Mutanten beschrieben sind.

Hierzu sollte erwähnt werden, daß zu Beginn dieser Arbeit lediglich die Sequenzen des Maroon-like-Proteins aus *Drosophila melanogaster* (Ma-l, GenBank AF162681) und des HxB-Proteins aus *Aspergillus nidulans* (heute: *Emericella nidulans*, GenBank AF128114) vorlagen. Die Vertreter aus *Bos taurus* (MCSU, GenBank AB036422) und *Homo sapiens* (HMCS, GenBank AK000740) erschienen hingegen erst im Verlauf dieser Arbeit in den Datenbanken. Außer den abgebildeten konnten in Datenbank-Analysen zwei weitere, über große Bereiche hinweg homologe Proteine aus *Caenorhabditis elegans* (GenBank CAA93672) und *Neurospora crassa* (GenBank AL389890) gefunden werden. Dieses sind jedoch nur putative Proteine, für die auch keine Mutanten bekannt, und die zudem gegenüber den anderen Moco-Sulfurasen C-terminal deutlich trunziert sind. Aus diesen Gründen finden sie auch keine Berücksichtigung im gezeigten Alignment. Anhand des Alignments wird ersichtlich, daß es sich hierbei um hochgradig homologe Proteine handelt, woraufhin auch auf eine konservierte Funktion geschlossen werden kann. Auffällig ist hierbei, daß die signifikantesten Homologien in der ersten Hälfte der Proteine auftauchen. Nach einer ausgedehnten Region mit nur sehr wenigen konservierten Bereichen gibt es dann im C-terminalen Drittel wieder starke Homologien. Eine derartige Verteilung von Homologien könnte auf eine Zwei-Domänen-Struktur, die von einer Linker-Region unterbrochen ist, hindeuten.

ABA3	1: . . . . .10 . . . . .20 . . . . .30 . . . . .40 . . . . .50 . . . . .60 . . . . .70 . . . . .80	
HMCS	1: . . . . .MEAFKEFGDYGYGPDG . . . . .PKNIQERDTEFKRLDKGVVYLDHAGSTLYSEOMYIFKQFTSNVFGN: 66	
MCSU	1: . . . . .MAGAAASGRELWTFAGSRDPSAPRLAYGYGPGSLRELRAREFSRLA.GTVYLDHAGATLSPQSOLSFSTSDMENYVGN: 79	
Ma-1	1: . . . . .MQRQRP . . . . .RALLP . . . . .RSP.GTVYLDHAGATLSPQSOLSFSTSDMENYVGN: 46	
HxB	1: . . . . .MTSYRPEFSASEQ . . . . .SQIDAEFSLASNSKSVYLDHAGATLVAESQVNTAAABQDQNRNVICN: 58	
Consensus	1: . . . . .MNLKSGTAAAYCSGYSED . . . . .VDVIREREYPLLKDTLYLDHAGATLVANSILHSFGSDTGNLYGN: 63	
ABA3	67: . . . . .90 . . . . .100 . . . . .110 . . . . .120 . . . . .130 . . . . .140 . . . . .150 . . . . .160	
HMCS	60: . . . . .PHSQDISAQSGLTADARHQVLYEVNASPEVYGLPMSGATALKLVGSETPWTQD . . . . .SNELMTMNNHNSVLGIR:140	
MCSU	47: . . . . .PHSQDISAQSGLTADARHQVLYEVNASPEVYGLPMSGATALKLVGSETPWTQD . . . . .SNELMTMNNHNSVLGIR:126	
Ma-1	59: . . . . .CRMGFVVDQVFKILEFFNTTADYHVIFANATAALSVAENEDFGSS . . . . .GEFHFCQNHNSVLGIR:128	
HxB	64: . . . . .PHSMASQLSAQRAGRYSLRALRFFFNADPDEFDLVGVANATAGILKLVADALQNSPQG . . . . .FWYGVYVDAHNSVLGIR:138	
Consensus	81: . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .*****:160	
ABA3	141: . . . . .170 . . . . .180 . . . . .190 . . . . .200 . . . . .210 . . . . .220 . . . . .230 . . . . .240	
HMCS	160: . . . . .NVTMAINVISIPVRPEDLWSAEBERGASAS . . . . .NPDQCLPHLFCYPAQSNFSGVRYPLSWIGER:218	
MCSU	127: . . . . .KITAMNVSSIPVRPEDMWSAERQDAAAG . . . . .DPAGQPPHLCYPAQSNFSGVRYPLSWIGER:186	
Ma-1	129: . . . . .ERVRENGIYMLRENEISGGKHKANGKVHEVS . . . . .GKTGNSLTLTSAQCNFSGVRYPLSWIGER:187	
HxB	139: . . . . .ELAKMGSRCFVNEDEVDSWISGLGSRREES . . . . .LGFAPPAQSNMNGRRVPMRWCEQ:192	
Consensus	161: . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .*****:240	
ABA3	221: . . . . .250 . . . . .260 . . . . .270 . . . . .280 . . . . .290 . . . . .300 . . . . .310 . . . . .320	
HMCS	219: . . . . .VKSQ . . . . .RLRFVTPGK . . . . .WVFLDAAASVSTSPDL . . . . .AHQADFVPISFYKIFGPTGLGALLVNNRAAP:283	
MCSU	187: . . . . .VKSQ . . . . .RRRPAIRPGK . . . . .WVFLDAAASVSTSPDL . . . . .VHQADFVPISFYKIFGPTGLGALLVNNRAAP:251	
Ma-1	188: . . . . .IQDGLAKPGKELW . . . . .SLGEEKKNNMHNDDYICLDAASVATSPDLQ . . . . .KYRPDYVCLSFYKIFGPTGLGALLVNNRAAP:265	
HxB	193: . . . . .IRAQ . . . . .KKNADN . . . . .MITYLDDAAASVSTSPDLQKIAAAPDTVLSFYKIFGPTGLGALLVNNRAAP:255	
Consensus	241: . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .*****:320	
ABA3	291: . . . . .330 . . . . .340 . . . . .350 . . . . .360 . . . . .370 . . . . .380 . . . . .390 . . . . .400	
HMCS	284: . . . . .LLRKT . . . . .YFSGGTAAASVSTSPDL . . . . .SVAQRFEDGTSFSDVIAKHGSDTERTTGG . . . . .MENKQHTFTLQ:354	
MCSU	252: . . . . .LLRKT . . . . .YFSGGTAAASVSTSPDL . . . . .SVAQRFEDGTSFSDVIAKHGSDTERTTGG . . . . .MESROHTFTLQ:322	
Ma-1	266: . . . . .VQKRRFFGGGTINYAYPHAMDYQLRE . . . . .TFHQRYLEDGLPFISIVGLEGGERTERVVPRTEDEFSTMERISRVFGLAK:343	
HxB	256: . . . . .VQKRRFFGGGTINYAYPHAMDYQLRE . . . . .TFHQRYLEDGLPFISIVGLEGGERTERVVPRTEDEFSTMERISRVFGLAK:329	
Consensus	321: . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .*****:400	
ABA3	360: . . . . .410 . . . . .420 . . . . .430 . . . . .440 . . . . .450 . . . . .460 . . . . .470 . . . . .480	
HMCS	355: . . . . .YVYMA . . . . .SSLYQYPNGAPVVRYSDEFS . . . . .SPEVGGPILNPNVLDLKGNIIGSQVDMKASHYNIILRRGCGCNAGCAQRH:432	
MCSU	323: . . . . .YVYMA . . . . .SSLYQYPNGAPVVRYSDEFS . . . . .SPEVGGPILNPNVLDLKGNIIGSQVDMKASHYNIILRRGCGCNAGCAQRH:400	
Ma-1	344: . . . . .LEDQ . . . . .RLHHHPNGEPLVKYKNGVGY . . . . .DKSRGGIVAPNVRTESSGSPVGGETACVAAHGLILRRGCGCNAGCAQRY:421	
HxB	330: . . . . .RLDRMNA . . . . .KHYNGSKVCQLYMSPNSSYDDASSG . . . . .GPIILNRSRGMWIGKSEVERIAIKNTQIRSGTICNPGGTLAL:409	
Consensus	401: . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .*****:480	
ABA3	439: . . . . .490 . . . . .500 . . . . .510 . . . . .520 . . . . .530 . . . . .540 . . . . .550 . . . . .560	
HMCS	433: . . . . .LGLSHSELRSNVE . . . . .AGHICWDDNDVINGKPTGAVRISFGVMSSTFFDAKKEIDELISS . . . . .FASP:498	
MCSU	401: . . . . .LGLSHSELRSNVE . . . . .AGHICWDDNDVINGKPTGAVRISFGVMSSTFFDAKKEIDELISS . . . . .FASP:477	
Ma-1	422: . . . . .LGLSHSELRSNVE . . . . .AGHICWDDNDVINGKPTGAVRISFGVMSSTFFDAKKEIDELISS . . . . .FASP:481	
HxB	410: . . . . .LGLSHSELRSNVE . . . . .AGHICWDDNDVINGKPTGAVRISFGVMSSTFFDAKKEIDELISS . . . . .FASP:466	
Consensus	481: . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .*****:560	
ABA3	499: . . . . .570 . . . . .580 . . . . .590 . . . . .600 . . . . .610 . . . . .620 . . . . .630 . . . . .640	
HMCS	512: . . . . .SADSQAD . . . . .VTPAVMGRRSLSPQ . . . . .DALTGSRVWNNS . . . . .STVNAVVPVAPPVCDVARTOPTSEKAAGVLEGALGPHVVTNLYL:589	
MCSU	478: . . . . .PEDSEAQNAMPAARAGSSSPQ . . . . .DTSPHSGVWNNSPTAVDAEGLCPPLDEATGTQOTTSEKAADVDPDGLDRSHVITNPLFL:557	
Ma-1	482: . . . . .TKPLQRIQFIEEQAEQLPPLLK . . . . .RVQLLR . . . . . . . . . .PKLLQMAI:518	
HxB	466: . . . . .VDPKPEGLPVPLTGNVSLHQ . . . . . . . . . .SFVYESLSV:496	
Consensus	561: . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .*****:640	
ABA3	537: . . . . .650 . . . . .660 . . . . .670 . . . . .680 . . . . .690 . . . . .700 . . . . .710 . . . . .720	
HMCS	590: . . . . .YPIKSCA . . . . .FVIR . . . . .WELCRTGLLDREWNVGLT . . . . .GAILHOKKVBEMSLIKTFIDTEEGLLSVESSRCEDK:608	
MCSU	558: . . . . .YPIKSCA . . . . .FVIR . . . . .WELCRTGLLDREWNVGLT . . . . .GAILHOKKVBEMSLIKTFIDTEEGLLSVESSRCEDK:608	
Ma-1	519: . . . . .YPIKSCA . . . . .FVIR . . . . .WELCRTGLLDREWNVGLT . . . . .GAILHOKKVBEMSLIKTFIDTEEGLLSVESSRCEDK:608	
HxB	497: . . . . .YPIKSCA . . . . .FVIR . . . . .WELCRTGLLDREWNVGLT . . . . .GAILHOKKVBEMSLIKTFIDTEEGLLSVESSRCEDK:608	
Consensus	641: . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .*****:720	
ABA3	609: . . . . .730 . . . . .740 . . . . .750 . . . . .760 . . . . .770 . . . . .780 . . . . .790 . . . . .800	
HMCS	661: . . . . .PHE . . . . . . . . . .ENSTQIRQSRVCA . . . . .STYDCGKXISS . . . . .LSTFFGRCPCN . . . . .IKQS . . . . .NSQRNAKHKHGKQLPGTMMAT:730	
MCSU	629: . . . . .PHE . . . . . . . . . .ENSTQIRQSRVCA . . . . .STYDCGKXISS . . . . .LSTFFGRCPCN . . . . .IKQS . . . . .NSQRNAKHKHGKQLPGTMMAT:730	
Ma-1	593: . . . . .S . . . . . . . . . .DQADTAKCVSKVCRQ . . . . .GELDCGDRVAQ . . . . .LSENGLMEGLRLRQ . . . . .GXRNSRSDQOK . . . . . . . . . .:651	
HxB	577: . . . . .S . . . . . . . . . .DQADTAKCVSKVCRQ . . . . .GELDCGDRVAQ . . . . .LSENGLMEGLRLRQ . . . . .GXRNSRSDQOK . . . . . . . . . .:651	
Consensus	721: . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .*****:800	
ABA3	679: . . . . .810 . . . . .820 . . . . .830 . . . . .840 . . . . .850 . . . . .860 . . . . .870 . . . . .880	
HMCS	730: . . . . . . . . . .INFANEAQFLLISEESVADINRRLEAKDEDYKR . . . . .AHEKLN . . . . .PHFRPNLVISG:730	
MCSU	730: . . . . . . . . . .INFANEAQFLLISEESVADINRRLEAKDEDYKR . . . . .AHEKLN . . . . .PHFRPNLVISG:730	
Ma-1	651: . . . . . . . . . .INFANEAQFLLISEESVADINRRLEAKDEDYKR . . . . .AHEKLN . . . . .PHFRPNLVISG:730	
HxB	657: . . . . . . . . . .INFANEAQFLLISEESVADINRRLEAKDEDYKR . . . . .AHEKLN . . . . .PHFRPNLVISG:730	
Consensus	801: . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .*****:880	
ABA3	730: . . . . .890 . . . . .900 . . . . .910 . . . . .920 . . . . .930 . . . . .940 . . . . .950 . . . . .960	
HMCS	783: . . . . .KRAFE . . . . .EKKDEISIG . . . . .SLRQVGLGPHRCRMCICIDQ . . . . .QNG . . . . .QRNQHVFK . . . . .SERSE . . . . .ETK . . . . .VNFGMYLMHASL:851	
MCSU	751: . . . . .KRAFE . . . . .EKKDEISIG . . . . .SLRQVGLGPHRCRMCICIDQ . . . . .QNG . . . . .QRNQHVFK . . . . .SERSE . . . . .ETK . . . . .VNFGMYLMHASL:851	
Ma-1	692: . . . . .GSAFE . . . . .ELTYKALSIG . . . . .GIQOVGEGPCRCRMCICIDQ . . . . .QNG . . . . .QRNQHVFK . . . . .SERSE . . . . .ETK . . . . .VNFGMYLMHASL:851	
HxB	737: . . . . .ISTAER . . . . .PIEDT . . . . .WASLSIGSGPEQLR . . . . .EDVIGSCRCRMCICIDQ . . . . .QNG . . . . .QRNQHVFK . . . . .SERSE . . . . .ETK . . . . .VNFGMYLMHASL:851	
Consensus	881: . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .*****:960	
ABA3	802: . . . . .970 . . . . .980 . . . . .990 . . . . .	
HMCS	852: . . . . .LSSPCFLSVGSQVLPVLKENVEGHDLFASEKHQDVTS:888	
MCSU	820: . . . . .LSSPCFLSVGSQVLPVLKENVEGHDLFASEKHQDVTS:888	
Ma-1	761: . . . . .TKELEPKQHMTCGDVVLE . . . . . . . . . .:780	
HxB	815: . . . . .KDAENGCLGTIMVGDVTPSYDNES . . . . . . . . . .:839	
Consensus	961: . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .***** . . . . .*****:997	

**Abb. 2.22: Alignment aller bisher klonierten putativen Moco-Sulfurasen.** Das Alignment enthält die Proteine ABA3 (*A. thaliana*; GenBank AF325457), HMCS (*H. sapiens*; GenBank BAA91354), MCSU (*B. taurus*, GenBank AB036422), Maroon-like (*D. melanogaster*, GenBank AF162681) und HxB (*A. nidulans*, GenBank AF128114).

### 2.4.1.1. Struktur und Signaturen des ABA3-Proteins

Nach dem Vergleich mit anderen putativen Moco-Sulfurasen wurde die ABA3-Primärsequenz einer computergestützten Signatur- und Funktionsanalyse unterzogen. Dazu wurden die im World-Wide-Web zugänglichen Expaty-Programme PrositeScan ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_prosite.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html)), PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/form.html>), ProfileScan ([http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/hits\\_motifscan](http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/hits_motifscan)) und SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) verwendet. Die Ergebnisse der Analyse sind in der Tabelle 2.4 zusammengefaßt und deuten ebenfalls eine Aufteilung des Proteins in zwei Domänen an.

**Tab. 2.4: Computergestützte Analyse der ABA3-Primärsequenz.** Verwendet wurden die im Text angegebenen Programme PrositeScan, ProfileScan, PSORT und SignalP. Es wurden nur Treffer mit mindestens 75%iger Identität zur jeweiligen Signatur-Consensus-Sequenz berücksichtigt. Dort, wo keine Homologien angegeben sind, handelt es sich entweder um einzelne Aminosäuren, die aufgrund besonderer Algorithmen berücksichtigt wurden, oder um die Eingruppierung mehrerer Signaturen in eine Protein-Klasse.

Signatur	Sequenz-Abschnitt	Position in ABA3	Consensus-Homologie	Funktion
Phosphopantetheine attachment site	MeNhNSVLGIReYALA LAQGASacAVDIeEAA	130 – 145 144 - 159	78% 77%	Übertragung kleiner Moleküle, wie z. B. Aminosäuren
Zinc finger (C2H2), DNA binding domain	CNPGACAKYLELSHSELRSNVEAGH	430 - 454	77%	Vermittelt Bindung an Nukleinsäuren
Leucine zipper pattern	rDTEFKRLDKGVVYLDHAGSTL LDKGVVYLDHAGSTLYSELQMe	25 – 46 32 - 53	75% 75%	Vermittelt Protein-Dimerisierung
Myc-type, 'helix-loop-helix' dimerization domain	cRTGLLHDreWMVQGL	553 - 568	77%	Dimerisierung von DNA-bindenden Proteinen
Eukaryotic RNA Recognition Motif (RRM) RNP-1 region	KGvYLDh RGNAYnLF	34 – 41 193 - 200	76% 89%	RNA-Bindung
Bacterial regulatory proteins, araC family	RVEEffEDgSASFLSIAAIRHGFKLL KSLTPSAIWMHtTSL QMINISNEAGLVKKSNEPLTTLAS YRRVKGKILFGTLIRYEIDEKR	317 – 357 759 - 804	83% 91%	DNA-Bindung bei Transkription-regulierenden Proteinen
Signal peptidases I signature 3	tVKIGDNHFTSLGG	741 - 754	92%	Entfernung von Signal-Peptiden
Signal peptide cleavage site	npgacakylelshs	437	/	Erkennungsstelle für Signalpeptidasen I
pyridoxal-phosphate attachment site	SFYKLFGYPTGLGALL YPIKSCAGFSVIRWpLCRT SYRRVKGKILFGTLrYEIDEK	268 - 283 537 – 555 782 - 803	89% 92% 84%	Bindung von Pyridoxal-Phosphat als Cofaktor
Aminotransferase class-V	IFKDFT..... LEVEKL	55 - 416	/	PLP-abhängiges NifS ähnliches Protein
Lipocalin signature	NLKRpDGSWFGy	399 - 410	83%	Transport kleiner hydrophob. Moleküle
G-protein coupled receptors family 1	ISSATsDLIAdaRHQVL GDNHFtSLgGCNRCQMI	73 – 89 745 - 761	76% 85%	Transduktion extrazellulärer Signale
Bipartite nuclear localization signal	KKSNEPLTTLASYRRVKG	771 - 788	99%	Transport des Proteins in den Kern

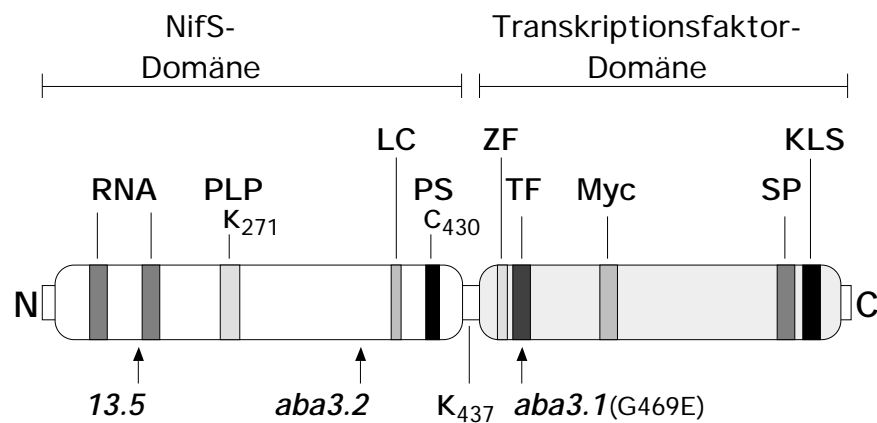
Während die gesamte N-terminale Hälfte des Proteins als Aminotransferase der Klasse V definiert werden kann, scheint der C-terminale Teil diverse regulative Funktionen, wie sie Transkriptionsfaktoren zueigen sind, zu vereinen. Zur Klasse der Aminotransferase der Klasse V gehören unter anderem die bakteriellen NifS-Proteine (NifS = Nitrogenfixation protein S) sowie die NifS-ähnlichen bakteriellen Proteine IscS, Csd und CsdB. Diese als Subklasse den Cystein-Desulfurasen zugeordneten Proteine stellen aus L-Cystein freigesetzten Schwefel für verschiedene Prozesse bereit. Hierzu gehören z. B. die NifS-katalysierte Synthese von Eisen/Schwefel-Clustern, die Thiamin-Biosynthese, die Biotin-Biosynthese sowie die Beladung von tRNAs mit Schwefel-haltigen Aminosäuren. Diejenigen Signaturen, die auf funktionelle Ähnlichkeiten von ABA3 mit NifS-Proteinen hindeuten, sind im Alignment der Abbildung 2.23 (A) besonders hervorgehoben. Hierbei handelt es sich um ein unter allen NifS- und NifS-ähnlichen Proteinen konserviertes Pyridoxalphosphat-(PLP) Bindungsmotiv mit einem invariablen Lysin sowie um eine konservierte Region mit einem invariablen Cystein für die Bindung eines Persulfides. Wie die Abbildung 2.23 (B) verdeutlicht, sind diese Regionen auch unter den putativen Moco-Sulfurasen besonders stark konserviert, wodurch eine den NifS-Proteinen analoge Funktion impliziert wird.

A	Pyridoxal-Phosphat-Bindung				Persulfid-Bindung			
A.thal.	268	SFYKLF	GYPTGLGAL	282	425	RTGCFC	NP	GA 434
A.vin.	199	CGHKLHA.	PKG	VGV	212	320	SSGSACT	SGS 329
T.mar.	220	SLHKMLG.	PTG	VGV	233	358	RS	HHCA... 364
S.sp.	228	SGHKMCA.	PTG	I	241	367	RS	HHCT... 373
		---	!*--	!-!*!-!			-*!--	!----
↑								
B								
A.thal.	268	SFYKLF	GYPTGLGAL	282	425	RTGCFC	NP	GA 434
H.sap.	261	SFYKIF	GFPTGLGAL	275	419	RTGCFC	NTGA	428
B.tau.	229	SFYKIF	GFPTGLGAL	243	387	RTGCFC	NTGA	396
D.mel.	243	SFYKIF	GYPTGV	GAL 257	408	RTGCFC	NP	NIGA 417
A.nid.	234	SFYKIF	GF	PD.LGAL 247	396	RS	GTLCNP	PGG 405
		!!!!	*!!*	*!***!!!			!*!***	!!-!*

**Abb. 2.23: Alignment der putativen Pyridoxal-Phosphat- und Persulfid-Bindungsregionen von ABA3 mit anderen Proteinen.** (A) Alignment dieser Regionen mit bakteriellen NifS (-ähnlichen) Proteinen von *Azotobacter vinelandii* (A.vin.), *Ter motoga maritima* (T.mar.) und *Synechocystis sp.* (S.sp). (B) Ausschnitt des Alignments aus Abb. 2.23 mit den entsprechenden Regionen der putativen Moco-Sulfurasen. Neben jeder Partialsequenz sind die entsprechenden Aminosäure-Positionen der jeweiligen Proteine angegeben. Pfeile kennzeichnen das invariable Lysin (K) bzw. das invariable Cystein (C).



Faßt man die bisher gesammelten Daten in einer schematischen Darstellung des ABA3-Proteins zusammen, so ergibt sich die in Abbildung 2.24 dargestellte Domänen-Struktur. Eine N-terminale, ca. 440 aa lange Domäne mit ausgeprägten Ähnlichkeiten zu bakteriellen NifS-Proteinen bzw. Aminotransferasen der Klasse V wird hierbei durch eine ca. 50 aa lange und weniger konservierte Region von der C-terminalen Domäne getrennt. Letztere wird aufgrund der Vielzahl von DNA-Bindungsmotiven vorläufig als Transkriptionsfaktor-Domäne bezeichnet. Die Zuordnung dieser Domäne ergibt sich zudem auch aus dem Kern-Lokalisierungssignal, welches in Zusammenhang mit DNA-Bindungsmotiven als besonders starke Evidenz für das Vorliegen einer Transkriptionsfaktor-Funktion angesehen werden muß. Besondere Erwähnung soll auch die Signal-Peptidase-Signatur erwähnen, da neben dieser auch eine dazu komplementäre Spaltstelle am Lysin437 im ABA3-Protein vorhanden zu sein scheint. Auch diese deutet auf eine vielleicht nicht nur funktionelle, sondern auch physikalische Trennung des Proteins in zwei Domänen hin.



**Abb. 2.24: Schematische Darstellung der Protein-Struktur von ABA3.** Grundlage dieser Abbildung sind die Homologien zu NifS-Proteinen und zu Signaturen anderer bereits charakterisierter Proteine. Fettgedruckte Abkürzungen über dem Modell stellen die verschiedenen Signaturen dar (RNA = RNA-Bindung; PLP = Pyridoxal-Phosphat-Bindung; LC = Lipocalin; PS = Persulfid-Bindung; ZF = Zink-Finger; TF = Transkriptionsfaktor TFIIB; Myc = Myc-Type „helix-loop-helix“; SP = Signal-Peptidase I; KLS = Kernlokalisierungssignal; K437 = Signal-Peptidase Spaltungsstelle). Unter dem Domänenmodell sind die Orte der Mutationen in den verschiedenen *aba3*-Mutanten dargestellt.

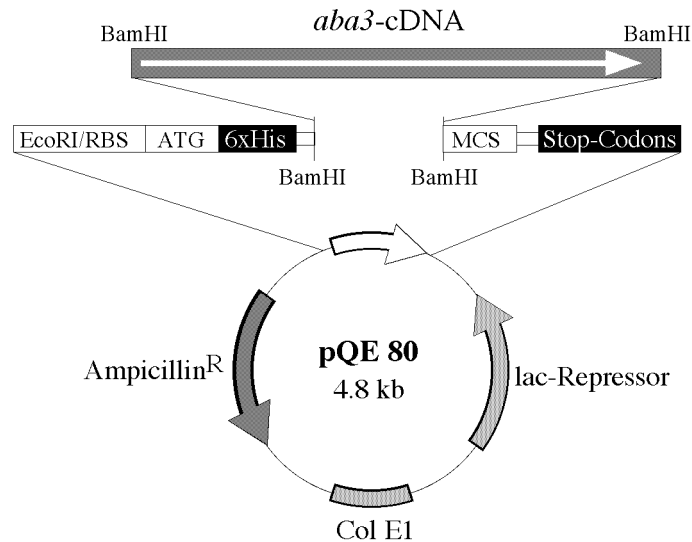
### 2.4.2. Expression und Aufreinigung von ABA3

Nach der Vorcharakterisierung des Proteins kann nun das rekombinante Protein gezielt einigen Versuchen unterzogen werden. Hierbei soll vor allem untersucht werden, ob ABA3 eine NifS-ähnliche Funktion besitzt, wie es die Homologien der N-terminalen Domäne andeuten. Zheng *et al.* (1993) konnten zeigen, daß NifS aus *Azotobacter vinelandii* die Schwefel-haltige Aminosäure L-Cystein als Schwefel-Donor für die Eisen/Schwefel-Cluster-Assemblierung verwendet. Dabei wird Schwefel aus L-Cystein freigesetzt, wodurch L-Alanin und Schwefel entstehen. Der freie Schwefel wird in Form eines Persulfids an das NifS-Protein gebunden, und zwar unter Beteiligung des proteingebundenen essentiellen Cofaktors Pyridoxal-Phosphat (PLP), der dem aufgereinigten Protein zudem eine deutlich gelbe Färbung verleiht. Ob der NifS-gebundene Schwefel *in vivo* anschließend direkt für die Assemblierung der Eisen/Schwefel-Cluster eingesetzt oder zunächst auf ein weiteres Protein übertragen wird, ist nicht ganz sicher. *In vitro* kann jedoch rekombinantes NifS allein die Schwefel-freie Apo-Eisen-Form des 4Fe4S-Cluster-Enzyms Nitrogenase rekonstituieren (Zheng & Dean, 1994). Inwiefern auch ABA3 eine solche Cystein-Desulfurase-Aktivität besitzt und in der Lage ist, seine Schwefel-freien, inaktiven Zielproteine AO und XDH durch Schwefel-Übertragung zu aktivieren, sollte mit Hilfe eines im Rahmen dieser Arbeit zu entwickelnden Assays mit rekombinanten Proteinen untersucht werden.

#### 2.4.2.1. Herstellung der Expressionskonstrukte

Für die Expression von ABA3 in *E. coli* wurde der pQE80-Vektor verwendet, der das exprimierte Protein mit einem N-terminalen 6xHis-Tag fusioniert. Dieser ermöglicht die affinitätschromatographische Aufreinigung des Proteins über Ni-NTA-Säulen sowie die Detektion mit His-Tag-spezifischen Antikörpern. Zuvor wurde jedoch die *aba3*-cDNA mittels PCR auf die Größe ihrer kodierenden Region verkürzt, um die 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche zu entfernen. Im 5'-Bereich wurde dazu vor dem Start-ATG eine BamHI-Site (GGATCC) so generiert, daß das nachfolgend kodierte Protein im selben Leseraster zu dem 6xHis-Tag am N-Terminus vorliegt. Zusätzlich wurde über dem Start-ATG eine NcoI-Site (CCATGG) generiert, um jederzeit in einen anderen Vektor wie den pQE60 mit C-terminalem His-Tag umklonieren zu können. Am 3'-Ende wurde hinter dem *aba3*-eigenen Stop-Codon ebenfalls eine BamHI-Site eingefügt, so daß die gesamte kodierende Region von 2457 bp

ungerichtet in den BamHI-geschnittenen pQE80 kloniert werden konnte (Abb. 2.25). Zur Expression verwendete Klone wurden nach Restriktionskontrolle stets durch vollständige Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft.



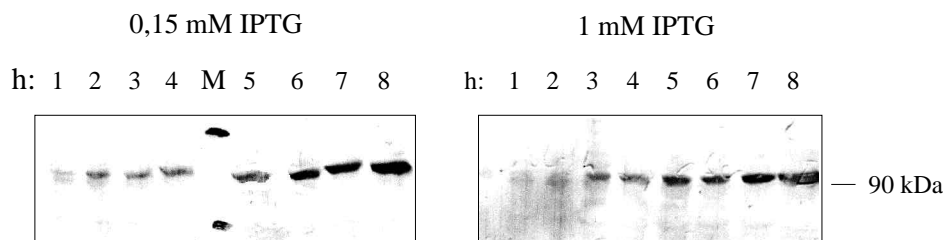
**Abb. 2.25:** Vektorkarte des Expressionskonstruktes pQE80/*aba3*. MCS = Multi-Cloning-Site mit BamHI/SphI/SacI/KpnI/SmaI/SalI/PstI/HindIII; RBS = Ribosomen-Bindungsstelle; Col E1 = Replikationsursprung.

#### 2.4.2.2. Überexpression von ABA3 in *E. coli*

Da es stets das Ziel ist, möglichst die maximale Proteinmenge in der löslichen Phase zu erhalten, müssen die optimalen Expressionsbedingungen für jedes neue zu exprimierende Protein zuvor ermittelt werden. Hierzu werden in der Regel zunächst Parameter wie die Expressionstemperatur, die Inkubationsdauer, die Zelldichte ( $OD_{600}$ ) vor der Induktion sowie die Konzentration des Induktors IPTG variiert. Im Rahmen der Ermittlung der Expressionsbedingungen für ABA3 wurden Temperaturen von 15°C, 22°C, 30°C und 37°C nach Induktion mit 0,15 mM als auch mit 1 mM IPTG getestet. In allen Fällen wurde bei einer  $OD_{600} = 0,5$  induziert und danach stündlich Proben entnommen, die in Western-Analysen mit His-Tag-Antikörpern analysiert wurden.

Bei den beiden Grenztemperaturen von 15°C bzw. 37°C konnte kein Protein detektiert werden, wohingegen bei 22°C eine schwache Expression nachweisbar war. Signifikant starke Expression

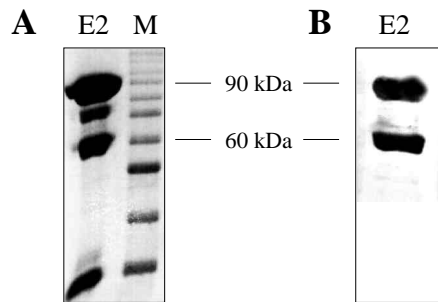
von ABA3 fand jedoch bei 30°C statt, und zwar sowohl nach Induktion mit 0,15 mM und 1 mM IPTG. Außerdem konnte gezeigt werden, daß mit fortschreitender Expressionsdauer die Proteinausbeute zunahm (Abb. 2.26). Basierend auf den dargestellten Erkenntnissen, wurden Expressionskulturen im kleinen wie im großen Maßstab bei einer  $OD_{600} = 0,5$  mit 0,5 mM IPTG induziert und danach für weitere 8-9 h bei 30°C inkubiert.



**Abb. 2.26: Expressionskinetik von ABA3 bei 30°C.** Je 25 µl *E. coli*-Rohextrakt wurden auf 10% SDS-PA-Gele aufgetragen und Coomassie-gefärbt (M = Marker, obere Bande 116 kDa; untere Bande 66,2 kDa).

#### 2.4.2.3. Affinitätschromatographische Aufreinigung von ABA3

In Maßstäben von bis zu drei 3 Litern Kulturvolumen gewonnener ABA3-Rohextrakt wurde wie unter 4.4.1.2 beschrieben über Ni-NTA-Tropfsäulen aufgereinigt und in 4 bis 6 Fraktionen von je 1 ml eluiert. Unter diesen Bedingungen sind ca. 95% des rekombinanten ABA3-Proteins in der zweiten Fraktion enthalten, die gegenüber den anderen Eluatfraktionen gelblich erscheint. Nach Auftrennung und Coomassie-Färbung dieser Fraktion im 10%igen PA-Gel traten zwei dominante Banden hervor, die auch in der Western-Analyse mit His-Tag-Antikörpern nachgewiesen werden konnten (Abb. 2.27). Die obere Bande von ca. 90 kDa korrespondiert sehr gut mit dem für ABA3 inklusive His-Tag kalkulierten Molekulargewicht von 92,6 kDa, wohingegen es sich bei der ca. 60 kDa-Bande eher um ein N-terminales Degradations- oder Spaltprodukt von ABA3 handelt. Andere in der Coomassie-Färbung auftretende Banden sind wohl eher auf mit der Säulenmatrix in unspezifischer Weise reagierende Proteine zurückzuführen.

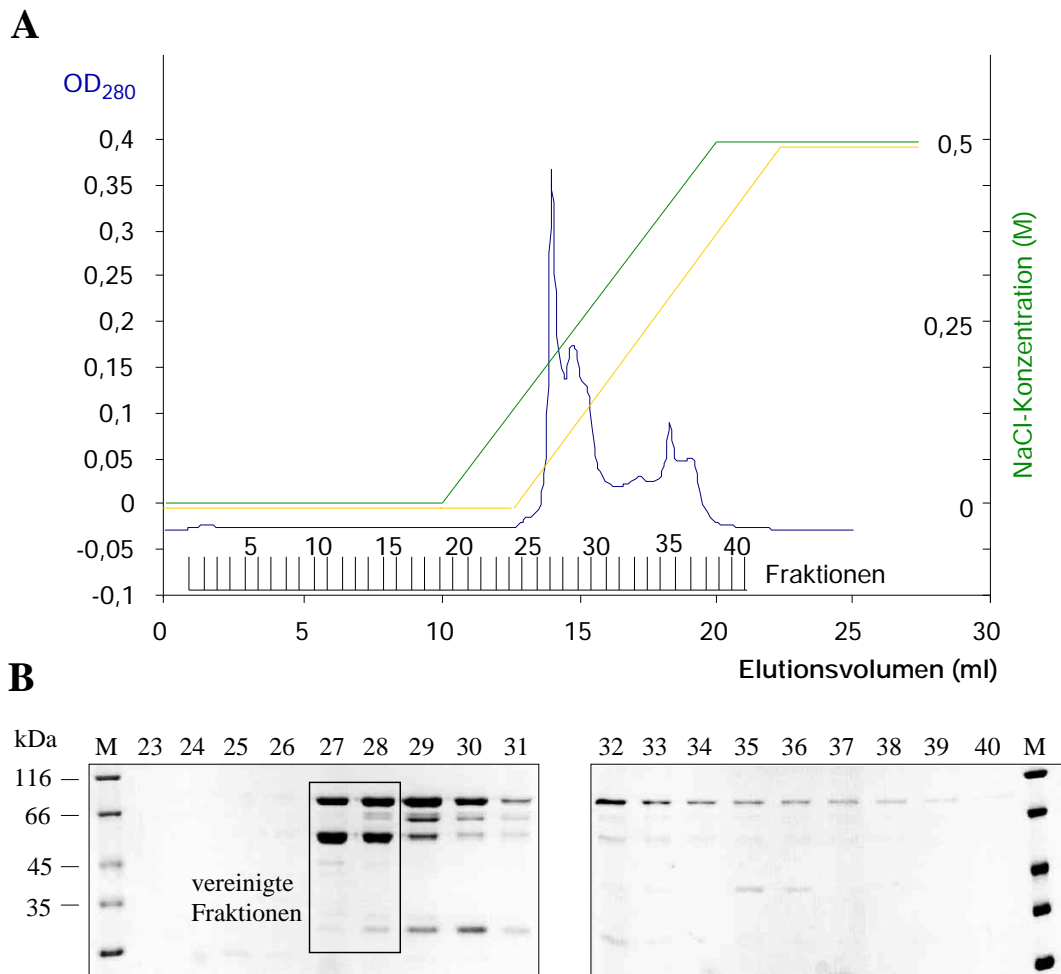


**Abb. 2.27: Affinitätschromatographisch aufgereinigtes ABA3.** 25  $\mu$ l der zweiten Eluatfraktion im 10%igen PA-Gel nach Coomassie-Färbung (A) und nach Western-Analyse mit His-Tag-Antikörpern (B).

Da die zweite Bande von 60 kDa in der Western-Analyse mit annähernd gleicher Intensität auftritt, wurde die Stabilität von ABA3 unter verschiedenen Bedingungen getestet. Inkubationen für je 6 h bei RT bzw. 37°C zeigten jedoch keine Änderung der Verhältnisse zwischen den beiden dominanten Banden. Auch Variationen in der Dauer der Proben-Denaturierung vor dem Auftragen auf Gele erbrachten keine Änderungen. Es muß daher angenommen werden, daß es sich hierbei um ein bereits in *E. coli* oder bei der Aufarbeitung der Rohextrakte stattfindendes Phänomen der Spaltung von ABA3 handelt, da auch Rohextrakte bereits dieses 2-Banden-Muster in der Western-Analyse aufweisen.

#### 2.4.2.4. Aufreinigung von ABA3 mittels Anionenaustauscher-Chromatographie

Die ABA3-haltigen Fraktionen wurden zunächst über PD10-Säulen in 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 umgepuffert und anschließend in Zentricons (MWCO = 30 kDa) auf 250  $\mu$ l aufkonzentriert. Zur weiteren Fraktionierung wurde das Konzentrat auf eine UNO Q-1 Anionenaustauscher-Matrix geladen und in einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Bei der Kontrolle von Fraktionen mit einem Absorptionsmaximum bei 280 nm im 10%igen SDS-PA-Gel zeigte sich, daß auch nach dieser Aufreinigung das „full-length“-Protein von ca. 90 kDa und das N-terminale Spaltprodukt von ca. 60 kDa koeluierten (Abb. 2.28). Auffälligerweise eluiert das „full-length“-Protein über viele Fraktionen hinweg, während das 60 kDa-Spaltprodukt besonders stark in den Fraktionen 27 und 28 vertreten ist. Diese wurden auch wegen ihrer starken Präsenz des „full-length“-Proteins und der guten Reinheit vereinigt und für einen Gelfiltrationsversuch verwendet.

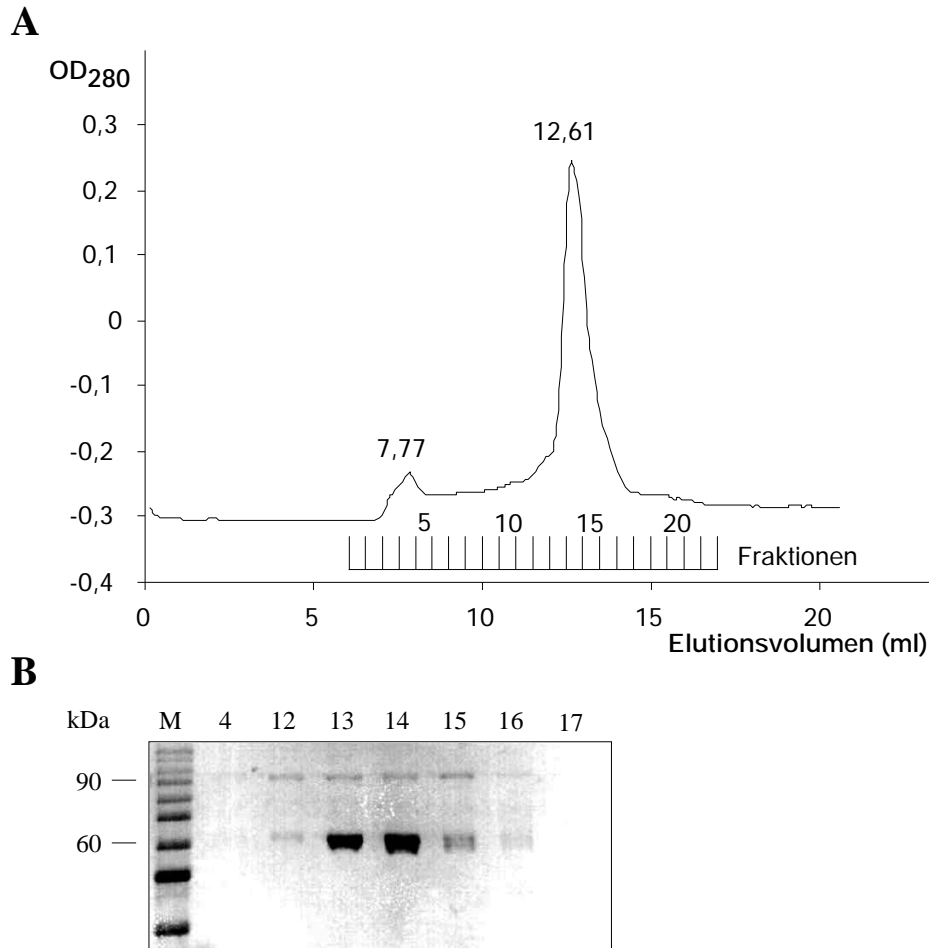


**Abb. 2.28: Aufreinigung von ABA3 im Anionenaustauscher-Verfahren.** (A) Das Chromatogramm zeigt neben der Absorptionskurve (blau) den vorgegebenen Verlauf des NaCl-Gradienten (grün). Die gelbe Kurve stellt dagegen den tatsächlichen Verlauf des Gradienten als Änderung der elektrolitischen Leitfähigkeit dar. (B) Coomassie-Färbung der im SDS-PAGE aufgetrennten Fraktionen 23 – 40 (M = Marker).

#### 2.4.2.5. Aufreinigung von ABA3 mittels Gelfiltration

Um die in den vereinigten Fraktionen aus 2.4.2.4. enthaltenen Proteine nach deren Molekulargewicht aufzutrennen, wurde eine Gelfiltration mit einer Superdex 200-Matrix und mit 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0 als Eluent durchgeführt. Dabei konnte nur ein dominanter Peak bei einem Elutionsvolumen von 12,61 ml detektiert werden, der einem Molekulargewicht von ca. 114 kDa entspricht (Abb. 2.29). Die SDS-PAGE-Analyse der

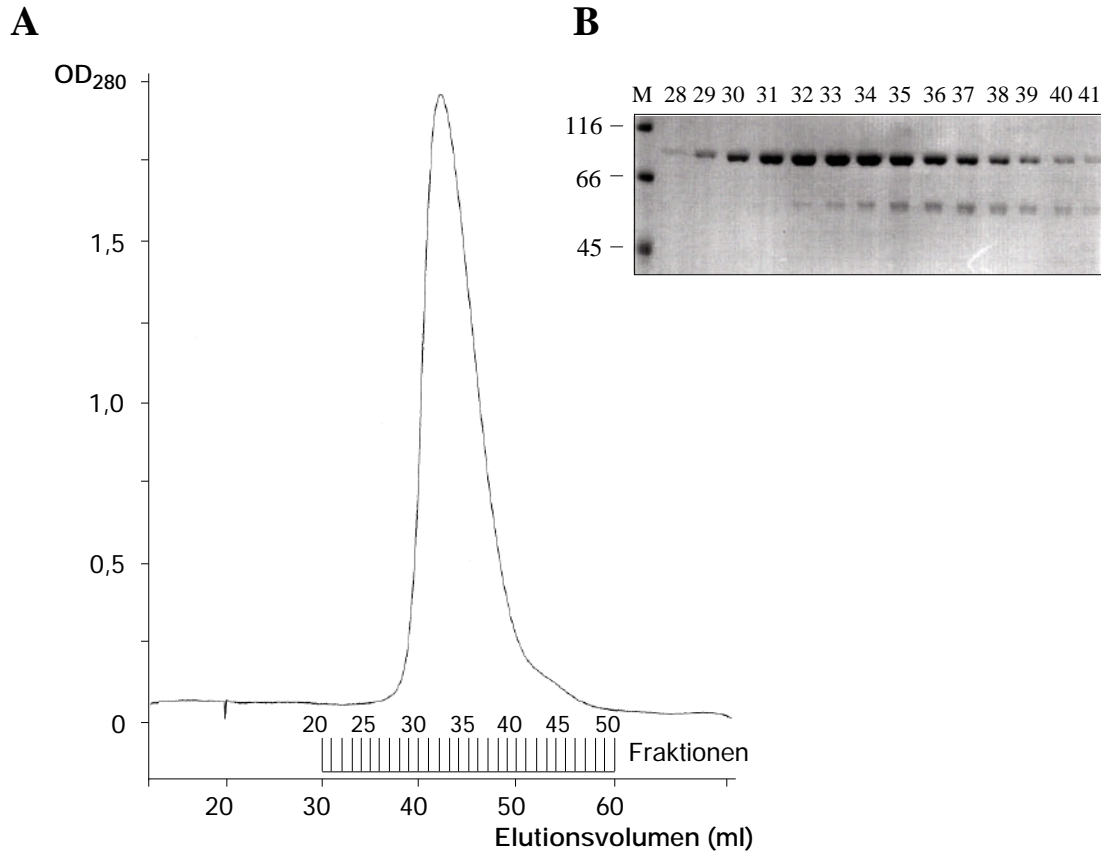
entsprechenden Fraktionen zeigte, daß sich unter diesem Peak vor allem das putative Spaltprodukt verbirgt, daneben und in den benachbarten Fraktionen aber auch das „full-length“-Protein.



**Abb. 2.29: Gelfiltration von ABA3 mit 100mM NaCl im Elutionspuffer. (A)** Chromatogramm der Gelfiltration von ABA3 nach Anionenaustauscher-Reinigung mit dem dominanten Peak bei 12,61 ml. **(B)** Coomassie-Färbung der im SDS-PAGE aufgetrennten Fraktionen 4, 12, 13, 14, 15, 16 und 17. Deutlich ist das 60 kDa-Spaltprodukt in den den Peak ausmachenden Fraktionen 13 und 14 zu erkennen (M = Marker).

Das durch den Peak repräsentierte Molekulargewicht von 114 kDa scheint einem Dimer des 60 kDa-Spaltproduktes zu entsprechen. Um das Elutionsverhalten des „full-length“-Proteins genauer analysieren zu können, wurde die Gelfiltration mit einer Anionenaustauscher-aufgereinigten Fraktion mit höherer Konzentration an „full-length“-Protein und mit 300 mM NaCl, 3 mM DTT und 0,1 mM Pyridoxalphosphat im Eluenten wiederholt. Wie in Abbildung 2.30 zu sehen, weist das „full-length“-Protein ein breites Elutionsprofil zwischen 36 und 52 ml

auf. Für das Protein in den Fraktionen, die das „full-length“-Protein enthielten, wurde ein Molekulargewicht von ca. 210 kDa berechnet. Dies deutet auf das Vorliegen von ABA3 in dimerer Form hin.



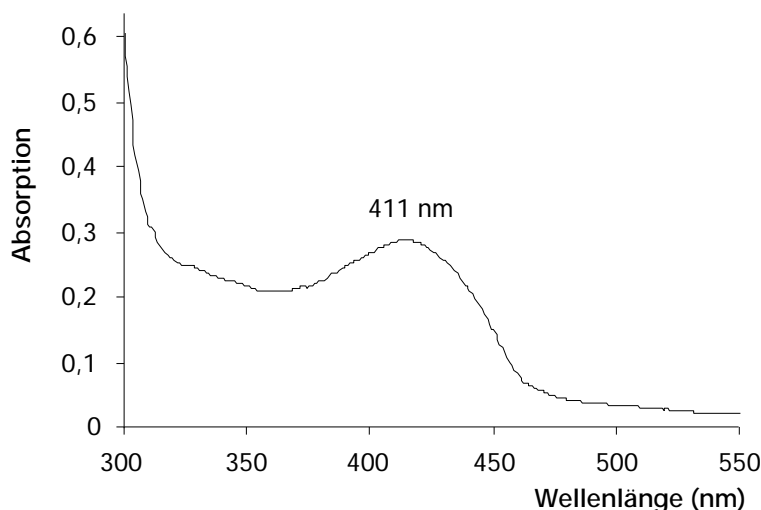
**Abb. 2.30: Gelfiltration von ABA3 mit 300 mM NaCl im Elutionspuffer. (A)** Chromatogramm des affinitäts- und Anionentauscher-gereinigten ABA3-Proteins mit nur einem Absorptionsmaximum. **(B)** Coomassie-Färbung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Fraktionen 28 bis 41. Das „full-length“-Protein eluiert vor allem in den Fraktionen 31 bis 38, das Spaltprodukt deutlich schwächer in den Fraktionen 32 bis 41 (M = Marker).

#### 2.4.2.6. Bestimmung des Absorptionsspektrums von ABA3

Proteine, die das Chromophor PLP als Cofaktor binden, erscheinen in aufgereinigter, konzentrierter Form gelblich. Dies ist auch bei PLP-bindenden NifS-Proteinen der Fall und gilt, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, auch für die putative Moco-Sulfurase ABA3 in Konzentrationen ab ca. 1 mg/ml. Neben der Färbung verleiht das PLP den entsprechenden Proteinen aber auch ein charakteristisches Absorptionsspektrum mit einem Maximum zwischen



390 und 420 nm. Die Abbildung 2.31 zeigt, daß auch das Absorptionsverhalten von ABA3 mit einem Maximum bei 411 nm gut mit dem von anderen PLP-abhängigen Proteinen korreliert. So besitzt z. B. NifS aus *Azotobacter vinelandii*, für das auch der Beweis von PLP als Cofaktor geführt wurde (Zheng *et al.*, 1993), ein Maximum bei 416 nm. Dies ist jedoch noch kein zwingender Beweis für die Bindung von PLP an ABA3, sondern lediglich für die Bindung irgendeines Chromophors, das ABA3 seine gelbe Färbung verleiht.



**Abb. 2.31: Absorptionsspektrum von ABA3.** Vermessen wurde 1 ml einer Ni-NTA aufgereinigten ABA3-Fraktion mit einer Konzentration von 1 mg/ml.

#### 2.4.3. Nachweis der Cystein-Desulfurase-Aktivität von ABA3

NifS- und NifS-ähnliche Proteine, die man allgemein zu den Cystein-Desulfurasen zählt, erhalten den zu übertragenden Schwefel aus dem Umsatz von L-Cystein. Unter Freisetzung von L-Alanin aus L-Cystein wird der dabei ebenfalls freiwerdende Schwefel in Form eines Persulfides an das jeweilige Enzym gebunden und damit für die Sulfurierung anderer Moleküle verfügbar gemacht. Ob dies so auch für ABA3 gilt, sollte im Rahmen der Charakterisierung des Schwefel-Donors und der Schwefel-Rezipienten von ABA3 untersucht werden. Daher galt es zunächst, den experimentellen Nachweis der Nutzung von L-Cystein als Substrat für ABA3 zu erbringen.

#### 2.4.3.1. „L-Alanin-Assay“ zur Bestimmung der Cystein-Desulfurase-Aktivität von rekombinantem ABA3

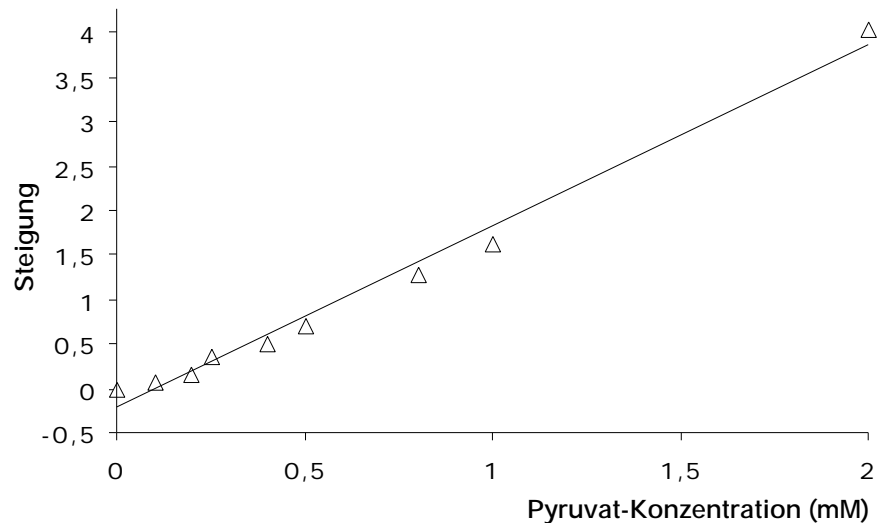
Ein möglicher Umsatz von L-Cystein zu L-Alanin und Schwefel durch ABA3 sollte in dem durch Zheng *et al.* (1993) beschriebenen L-Alanin-Assay festgestellt werden. Hierbei wird nach Umsatz von L-Cystein in einer ersten Folgereaktion durch eine Glutamat-Pyruvat-Transaminase eine Aminogruppe des gebildeten L-Alanins auf  $\alpha$ -Ketoglutarat übertragen, wodurch Glutamat und Pyruvat entstehen. Während einer zweiten Folgereaktion wird das gebildete Pyruvat unter NADH-Verbrauch anschließend durch das Enzym Lactat-Dehydrogenase zu Lactat reduziert. Durch Messung der NADH-Absorptionsabnahme bei 340 nm kann der Verlauf der Reaktion verfolgt und dadurch der Umsatz des eingesetzten L-Cysteins quantifiziert werden. Um zu überprüfen, ob zwischen der Konzentration des gebildeten Pyruvats und der Geschwindigkeit der bei 340 nm gemessenen Absorptionsabnahme (Verbrauch von NADH durch die Lactat-Dehydrogenase) ein linearer Zusammenhang besteht, wurde zunächst eine Standardkurve mit Pyruvat-Lösungen bekannter Konzentrationen erstellt (Tab. 2.5). Als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit diente die Steigung der bestimmten Absorptionskurven.

**Tab. 2.5: Ermittlung der Steigungen von Pyruvat-Standards.** 250  $\mu$ l der jeweiligen Pyruvat-Lösungen wurden dazu zu 18 U Lactat-Dehydrogenase in 1 ml 250 mM Tris-HCl, pH 9,3 gegeben und nach Zugabe von 250  $\mu$ l 0,58 mM NADH für jeweils 90 s bei 340 nm vermessen. Pro Konzentration wurden drei Messungen durchgeführt.

Pyruvat-Konzentration (mM)	Steigung der Absorptionskurve (je 3 Messungen)			Mittelwert der Steigungen
0,1	0,11	0,045	-	0,078
0,2	0,21	0,19	0,0812	0,16
0,25	0,42	0,285	0,41	0,37
0,4	0,46	0,68	0,35	0,496
0,5	0,76	0,63	0,76	0,71
0,8	1,99	1,04	0,8	1,27
1,0	1,35	1,76	1,79	1,63
2,0	2,98	5,27	3,91	4,05

Aus den Mittelwerten der gemessenen Steigungen wurde eine Regressionsgerade über die variablen Pyruvatkonzentrationen berechnet (Abb. 2.32). Hierbei wird deutlich, daß die einzelnen Meßwerte gut miteinander korrelieren (Korrelationskoeffizient  $r=0,976$ ), was für einen linearen Zusammenhang zwischen den gemessenen Steigungen der Absorptionskurven und der Substratkonzentration spricht. Diese Methode eignet sich somit auch für quantitative

Bestimmungen. Unter den hier gewählten Bedingungen befindet sich der optimal meßbare Bereich zwischen 0,2 und 1 mM Pyruvat. Bei niedrigeren Konzentrationen nimmt die Ungenauigkeit zu, während bei höheren die Reaktion zu schnell für eine präzise Bestimmung des linearen Bereichs verläuft.



**Abb. 2.32: Standardgerade für Pyruvat.** Die zur Erstellung dieser Geraden herangezogenen Werte entstammen den Mittelwerten der Steigungen aus Tabelle 2.5.

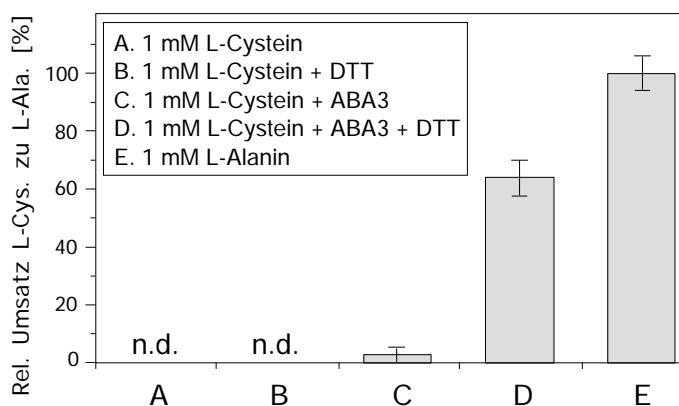
Es wurde ebenfalls überprüft, ob L-Alanin durch die Glutamat-Pyruvat-Transaminase vollständig zu Pyruvat umgesetzt wird. Eine 1 mM L-Alanin-Lösung in 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 wurde dazu für 1 h mit 1 Unit Glutamat-Pyruvat-Transaminase inkubiert und anschließend vermessen. Es zeigte sich, daß unter den gewählten Bedingungen etwa 80 % des eingesetzten L-Alanins zu Pyruvat umgesetzt werden konnten. Deshalb müssen bei quantitativen Versuchen L-Alanin-Standards statt Pyruvat-Standards mitgeführt werden.

Um eine eventuell vorhandene Cystein-Desulfurase-Aktivität von ABA3 nachzuweisen, wurden zwei Reaktionsansätze erstellt. Im ersten Ansatz wurden 200 µg Ni-NTA-aufgereinigtes ABA3 und 1 mM L-Cystein in 300 µl 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 vorgelegt, zum anderen wurde zusätzlich 1 mM DTT hinzugegeben. Durch gleichzeitiges Mitführen eines L-Alanin-Standards ergab sich die Möglichkeit, den prozentualen Anteil des umgesetzten L-Cysteins als ein Maß für die Aktivität von ABA3 zu errechnen. Nach Aufzeichnung der Absorptionsabnahme innerhalb von 30 s wurden die in der Tabelle 2.6 dargestellten Werte erhalten.

**Tab. 2.6: Bestimmung des durch ABA3 aus L-Cystein produzierten L-Alanins.** Als Kontrollen wurden Proben mitgeführt, die zwar L-Cystein (und DTT), aber kein Protein enthielten. Von allen Reaktionen wurden jeweils drei Parallelansätze vermessen, deren Mittelwerte zur Bestimmung des prozentualen Umsatzes von L-Cystein herangezogen wurden.

Ansatz	OD <sub>340</sub>			Mittelwert	Standard- Abweichung	L-Cystein- Umsatz in %
	(1)	(2)	(3)			
L-Cystein	0	0	0	0	0	0
L-Cystein+ DTT	0	0	0	0	0	0
L-Cystein+ Aba3	0,015	0	0,02	0,0117	0,0104	2,76
L-Cystein+ Aba3+DTT	0,25	0,3	0,26	0,27	0,0265	63,78
L-Alanin- Standard	0,45	0,4	0,42	0,4233	0,0252	( 100)

In der graphischen Darstellung der Meßwerte wird deutlich, daß nur in Anwesenheit von DTT ein signifikanter Umsatz von L-Cystein zu L-Alanin durch ABA3 stattfindet (Abb. 2.33). Dieses Ergebnis wird durch die subjektive Beobachtung untermauert, daß der DTT-haltige Reaktionsansatz mit ABA3 aufgrund des freigesetzten Schwefels während der Inkubation einen wesentlich stärkeren H<sub>2</sub>S-Geruch entwickelte als der DTT-freie Ansatz. Mit Hilfe der bestimmten L-Alanin-Mengen kann berechnet werden, daß durch 1 Mol ABA3 in Gegenwart von DTT und unter den hier verwendeten Bedingungen 1,5 Mol L-Cystein/h umgesetzt wurden. Bei Wiederholungen des Versuchs mit anderen ABA3-Proben zeigte sich jedoch, daß die Aktivität von ABA3 sehr schwankt und bis auf 20% der hier angegebenen Werte herabsinken kann. Dies ist vermutlich auf unterschiedliche Qualitäten der Proteinpräparationen zurückzuführen.



**Abb. 2.33: Nachweis des durch ABA3 aus L-Cystein gebildeten L-Alanins.** Die Säulen A und B stellen Kontrollen ohne ABA3-Protein dar (n.d. = nicht detektierbar), die Säule E repräsentiert die Reaktion zur Kalibrierung des Assays und wurde = 100% gesetzt. Die Säulen C und D repräsentieren die nach 1 h bei 30°C in 0,3 ml 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 aus L-Cystein durch 200 µg ABA3 gebildete Menge L-Alanin.

#### 2.4.3.2. Inhibierung von ABA3 durch Behandlung mit alkylierenden Agenzien

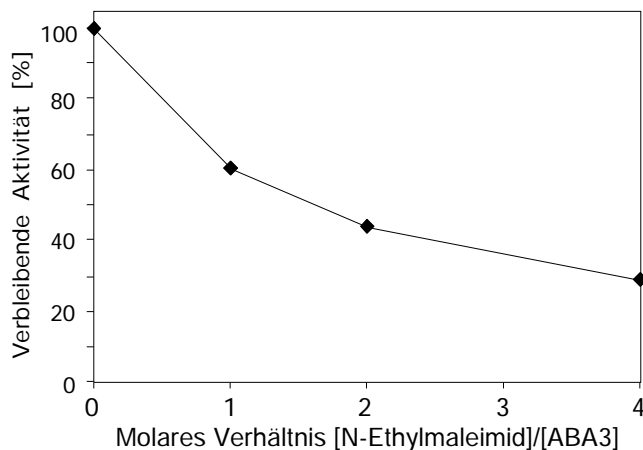
Basierend auf Primärstruktur-Vergleichen von NifS-Proteinen mit eukaryontischen Moco-Sulfurasen, kann angenommen werden, daß auch in ABA3 ein „active-site“ Cysteiny-Rest für die Bindung des Persulfides verantwortlich und an der Katalyse beteiligt ist (s Abb. 2.23). In diesem Fall sollte das Protein durch Behandlung mit Thiol-spezifisch alkylierenden Agenzien wie Iodoacetat oder N-Ethylmaleimid inaktiviert werden können, wie es bereits für das NifS-Protein aus *Azotobacter vinelandii* gezeigt werden konnte (Zheng *et al.*, 1993). Zur Überprüfung dieser Annahme wurden 350 µg ABA3 (3,5 nmol) mit einer äquimolaren Menge bzw. mit je einem doppelten und einem vierfachen Überschuß an N-Ethylmaleimide in 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,0 für 3 h bei 30°C inkubiert. Als Referenz wurde gleichermaßen eine N-Ethylmaleimid-freie Probe mitgeführt. Das Alkylierungsreagens wurde über eine Sephadex G-50 Säule vom Protein abgetrennt bevor 200 µg des Proteins in Gegenwart von 1 mM DTT für die Bestimmung der Cystein-Desulfurase-Aktivität herangezogen wurden. Wie die im L-Alanin-Assay ermittelten Steigungen im Vergleich mit einem 1 mM L-Alanin-Standard zeigen, wurden 37,1% des eingesetzten L-Cysteins durch das unbehandelte ABA3 umgesetzt (Tab. 2.7).

**Tab. 2.7: Einfluß von N-Ethylmaleimid auf die ABA3-Aktivität.** 3,5 nmol ABA3 wurden hierzu mit steigenden Mengen des Thiol-spezifischen Alkylierungsreagens N-Ethylmaleimid behandelt, bevor die ABA3-Aktivität durch Umsatz von L-Cystein im L-Alanin-Assay bestimmt wurde.

Ansatz	Steigung	relative Aktivität in %
1 mM L-Alanin (Referenz)	0,515	/
ABA3 unbehandelt	0,1909	100
ABA3 + N-EM (1:1)	0,115	60,2
ABA3 + N-EM (1:2)	0,0844	44,2
ABA3 + N-EM (1:4)	0,055	28,8

Aus der graphischen Darstellung der Meßwerte wird deutlich, daß die Cystein-Desulfurase-Aktivität von ABA3 sensitiv gegenüber einer Behandlung mit N-Ethylmaleimid ist (Abb. 2.34). So konnte bei vierfachem Überschuß des Alkylierungsreagens eine Reduktion der Cystein-Desulfurase-Aktivität von 71,2% erzielt werden. Zwar ist die Inaktivierung von NifS aus *Azotobacter vinelandii* unter vergleichbaren Bedingungen vollständig, jedoch stehen im Falle von Nifs vier Cystein-Reste der Alkylierung zur Verfügung, wohingegen ABA3 18 solcher

Cystein-Reste besitzt. Es ist daher wohl anzunehmen, daß, wenn auch nicht alle Cysteine im ABA3-Protein an „active sites“ teilhaben, mehr als ein vierfacher molarer Überschuß von N-Ethylmaleimid für eine vollständige Inaktivierung von ABA3 notwendig wäre. Es muß aber berücksichtigt werden, daß dieser Versuch lediglich dazu dienen kann, die Beteiligung irgendeines Cystein-Restes an der L-Cystein-Desulfuration nachzuweisen. Die Bestimmung des wirklich beteiligten Cystein kann nur über die gezielte Mutagenese dieser Aminosäure erfolgen.



**Abb. 2.34: Inaktivierung von ABA3 durch N-Ethylmaleimid.** Grundlage dieser Darstellung sind die Meßwerte der Tabelle 2.7. Als Referenz zur Bestimmung der relativen Cystein-Desulfurase-Aktivität von ABA3 nach Behandlung mit N-Ethylmaleimid diente das unbehandelte Protein, dessen Wert = 100% gesetzt wurde ( zeigt die verbleibende ABA3-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor an).

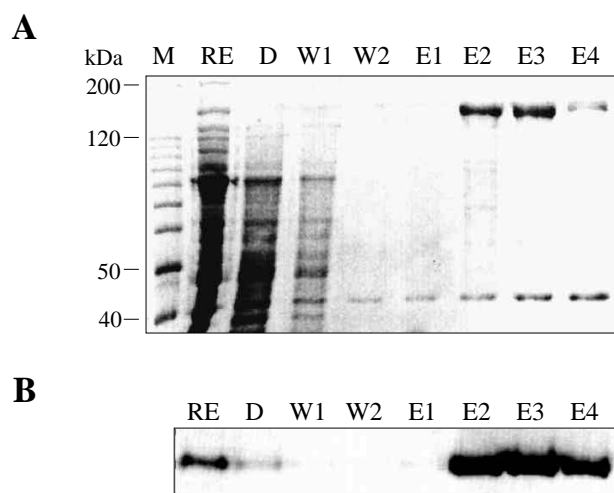
#### 2.4.4. Entwicklung eines definierten *in vitro*-Systems zur Sulfurierung pflanzlicher Aldehydoxidasen durch ABA3

Nachdem mit dem L-Alanin-Assay ein System zum Nachweis der Cystein-Desulfurase-Aktivität von ABA3 etabliert werden konnte, sollte nun auch die Übertragung des enzymgebundenen Schwefels auf seine Rezipienten AO und XDH, also die postulierte Sulfurtransferase-Funktion, gezeigt werden. Hierzu wurde ein *in vitro*-System entwickelt, das neben rekombinantem ABA3 als Schwefel-Donor auch eine rekombinante Aldehydoxidase (AO) als Schwefel-Rezipient sowie alle weiteren für die Reaktion notwendigen Komponenten enthält. Freundlicherweise wurde dazu ein die *Arabidopsis*-Aldehydoxidase AAO1 überexprimierender *Pichia pastoris*-Stamm von Prof. Tomokazu Koshiba (Metropolitan University, Tokio) zur Verfügung gestellt. Die AAO1 repräsentiert eines von vier beschriebenen AO-Genen in *Arabidopsis*, wobei zwei der von *aaol* kodierten Protein-Monomere das funktionell aktive Homodimer der AO darstellen. Da die

Expression der AAO1 bzw. der AO sowie deren Substratspezifitäten gut charakterisiert sind (Koiwai *et al.*, 2000), wurde diese für die Versuche zur *in vitro*-Sulfurierung herangezogen.

#### 2.4.4.1. Überexpression der Aldehydoxidase AAO1 aus *Arabidopsis* in *Pichia pastoris*

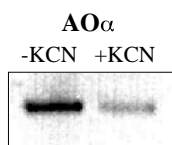
In Vorversuchen zur Expression der AAO1 konnten zunächst die von Koiwai *et al.* (2000) beschriebenen Expressionsbedingungen reproduziert werden. Die damit erhaltenen Rohextrakte wurden anschließend über Ni-NTA-Säulen aufgereingt und die Fraktionen sowohl im SDS-Gel auf ihre Reinheit als auch im nativen Gel auf ihre Aktivität hin überprüft (Abb. 2.35).



**Abb. 2.35: AAO1-Fraaktionen nach Ni-NTA-Aufreinigung.** (A) Coomassie-gefärbtes 10%iges SDS-PA-Gel mit je 15 µl der angegebenen Fraktionen. (B) 7,5%iges PA-Aktivitätsgel mit je 3 µl der angegebenen Fraktionen (gefärbt mit Indol-3-Carboxaldehyd als Substrat; M = Marker, RE = Rohextrakt, D = Durchfluß, W = Waschfraktionen, E = Eluatfraktionen).

Interessanterweise ist die in *Pichia* exprimierte und aufgereinigte AAO1 bereits aktiv, wie der Aktivitätsnachweis in Abbildung 2.35 (B) zeigt. *Pichia* scheint demnach in der Lage, alle erforderlichen posttranslationalen Modifikationen durchzuführen. Da der Großteil der AAO1 in den Eluatfraktionen E2 und E3 enthalten ist, wurden diese für die weiteren Versuche verwendet. Im Rahmen der Etablierung eines Assays zur *in vitro*-Sulfurierung von rekombinanter AO durch ABA3 sollte die AO möglichst aus einer inaktiven, d. h. schwefelfreien Form in ihre aktive Form überführt werden. Hierzu wurde an der aktiven AO eine Behandlung mit Kalium-Cyanid durchgeführt, wodurch der terminale Schwefel-Ligand des Mocos als Thio-Cyanat abgespalten wird. Die Desulfurierung erfolgte in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 8,0 in Gegenwart von 50 mM KCN und 750 µg rekombinanter AO für 1 h bei RT in einem Volumen

von 1,5 ml. Nach Abschluß der Reaktion wurde das Cyanid über eine PD10-Säule entfernt und ein Aliquot von 1,5 µg der so behandelten AO in einem Aktivitätsgel gegen eine unbehandelte Kontrolle getestet (Abb. 2.36).



**Abb. 2.36: Inaktivierung der AO $\alpha$  durch Behandlung mit KCN.** Je 1,5 µg einer unbehandelten (links) und einer KCN-behandelten (rechts) Probe wurden auf einem 7,5%igen PA-Gel aufgetrennt und mit Indol-3-Carboxaldehyd als Substrat angefärbt.

Da mit der KCN-Behandlung die ursprüngliche Aktivität der aus *Pichia* gereinigten AO erheblich reduziert werden konnte, sollte vor allem diese eine eventuell durch ABA3 stattfindende Sulfurierung stärker verdeutlichen als die unbehandelte Form.

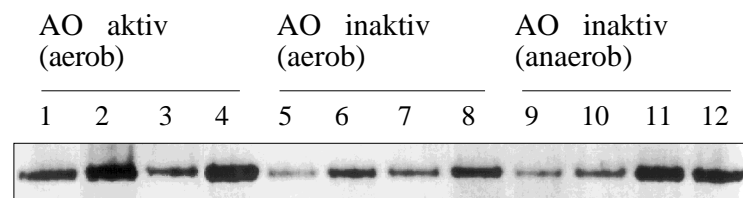
#### 2.4.4.2. Bestimmung der Moco-Sulfurase-Aktivität von ABA3 durch *in vitro*-Sulfurierung von rekombinanter AO $\alpha$

Für den Nachweis der Moco-Sulfurase-Funktion von ABA3 wurden jeweils 60 µg KCN-behandelte oder unbehandelte AO mit je 180 µg ABA3 eingesetzt. Beide Enzyme wurden zuvor in 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 umgepuffert, da auch in diesem Puffer die Reaktion durchgeführt wurde. Zusätzliche Substanzen wie L-Cystein als Substrat für ABA3 sowie Natrium-Sulfid und Natrium-Dithionit für eine chemische Kontroll-Rekonstitution der inaktiven AO wurden in Konzentrationen von je 1 mM hinzugegeben. Die Reaktionen wurden schließlich in einem Volumen von je 400 µl bei 30°C in den in Tabelle 2.8 aufgeführten Variationen durchgeführt. Die eigentlichen Rekonstitutionsansätze wurden durch die Reaktionen Nr. 4 und Nr. 8 gestellt, die Reaktion Nr. 12 sollte den maximal erreichbaren Sulfurierungszustand der inaktivierten AO durch chemische Rekonstitution repräsentieren. Alle weiteren Reaktionen stellen zusätzliche Kontrollen dar. Für die Analyse der Rekonstitutionsansätze wurden je 20 µl einer jeden Reaktion im nativen PA-Gel einer Aktivitätsfärbung mit Indol-3-Carboxaldehyd unterzogen (Abb. 2.37).



**Tab. 2.8: Variationen des *in vitro*-Sulfurierungs-Assays.** Die verschiedenen Ansätze wurden dabei in drei Klassen geteilt: Aerobe Ansätze mit aktiver bzw. KCN-inaktivierter AO sowie anaerobe Ansätze mit inaktivierter AO. Wichtigster Kontrollansatz ist die Nr. 12: Dieser Ansatz dient der Bestimmung der maximal zu erreichenden Aktivität der inaktivierten AO durch die anaerobe Rekonstitution mit Sulfid und Dithionit. Rekonstitutionsansätze von besonderer Bedeutung sind unterstrichen.

Nr.	aerobe Ansätze mit AO <b>aktiv</b> (a) (unbehandelt)	Nr.	aerobe Ansätze mit AO <b>inaktiv</b> (i) (KCN-behandelt)	Nr.	anaerobe Ansätze mit AO <b>inaktiv</b> (i) alle mit Dithionit
1	AO (a) + Puffer	5	AO (i) + Puffer	9	AO (i) + ABA3
2	AO (a) + ABA3	6	AO (i) + ABA3	10	AO (i) + Cystein
3	AO (a) + Cystein	7	AO (i) + Cystein	11	AO (i) + ABA3 + Cystein
4	<u>AO (a) + ABA3 + Cystein</u>	8	<u>AO (i) + ABA3 + Cystein</u>	12	<u>AO (i) + Sulfid</u>



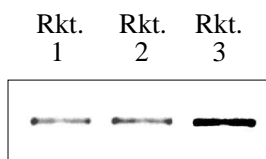
**Abb. 2.37: Sulfurierung der rekombinanten AO $\alpha$  durch ABA3.** Die Nummerierung der Proben ist der Tabelle 2.8 entnommen. Je Spur wurden 20  $\mu$ l des Reaktionsansatzes aufgetragen und im nativen 7,5%igen PA-Gel mit Indol-3-Carboxaldehyd als Substrat gefärbt.

Die Abbildung 2.37 macht deutlich, daß die aus *Pichia Pastoris* aufgereinigte unbehandelte AO eine Basalaktivität besitzt (Spur 1), die bereits durch alleinige Zugabe von ABA3 gesteigert werden kann (Spur 2). Die Gegenwart von L-Cystein im Ansatz scheint die Effizienz der Sulfurierung kaum zu steigern, was dadurch erklärt werden kann, daß ABA3 seinerseits bereits in einem aktiven, d. h. Persulfid-beladenen Zustand aufgereigt wurde (Spuren 3 und 4). Da ABA3 gegenüber der AO im Überschuß vorliegt, wirken weder die Konzentration des L-Cysteins noch von ABA3 limitierend auf die Sulfurierung. Analog dazu verhalten sich die vier Ansätze mit der KCN-inaktivierten AO unter aeroben Bedingungen in den Spuren 5-8, jedoch mit entsprechend der Inaktivierung verminderten Intensitäten. Der Zusatz von L-Cystein zu ABA3 scheint hier einen größeren Einfluß zu haben und die Sulfurierung zu unterstützen. Hierbei wird jedoch nicht der maximal mögliche Sulfurierungszustand des anaerob mit Sulfid

und Dithionit behandelten Enzyms erreicht (Spur 12). Eine hiermit vergleichbare Restauration des inaktivierten Enzyms konnte nur durch die ebenfalls anaerobe Koinkubation der AO mit ABA3, Dithionit und L-Cystein erreicht werden (Spur 11).

Die aerobe Aktivierung der AO durch ABA3 in Abwesenheit von L-Cystein zeigt deutlich, daß ABA3 bereits im Persulfid-beladenen Zustand aus *E. coli* aufgereinigt wurde. Um zu zeigen, daß ABA3 auch im Persulfid-freien Zustand mit L-Cystein als Schwefel-Quelle zur Restauration der AO in der Lage ist, wurde mit Hilfe des Sulfhydrylreagenzes DTT die Persulfid-Bindung vor dem Assay reduktiv gespalten. Hierzu wurden 200 µg affinitätschromatographisch aufgereinigtes ABA3 in 300 µl Ni-NTA-Elutionspuffer in Gegenwart von 2 mM DTT für 1 h bei 30°C inkubiert und anschließend in 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 umgepuffert. Zur Detektion der Moco-Sulfurase-Aktivität von Persulfid-freiem und Persulfid-beladenem ABA3 wurde ein AO-Rekonstitutionsassay mit jeweils 20 µg inaktivierter AO und desulfuriertem ABA3 in insgesamt 100 µl durchgeführt. Nach einstündiger Inkubation bei 30°C wurden je 20 µl der Ansätze im AO-Aktivitätsgel kontrolliert (Abb. 2.38).

Da eine Rekonstitution der AO -Aktivität nur in Gegenwart von L-Cystein erreicht wurde, konnte gezeigt werden, daß (1.) ABA3 in den vorangegangenen Versuchen bereits in der Persulfid-beladenen Form aus *E. coli* aufgereigt wurde, (2.) die Persulfid-freie Form von ABA3 zu keiner AO-Rekonstitution imstande ist und (3.) L-Cystein von ABA3 umgesetzt und als Schwefel-Quelle zur Aktivierung der AO genutzt wurde.



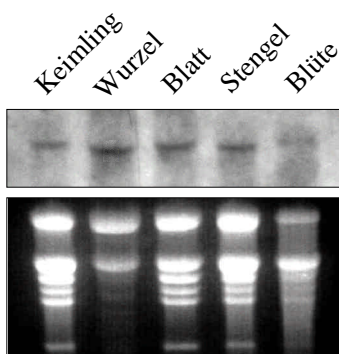
**Abb. 2.38: Sulfurierung inaktivierter rekombinanter AO $\alpha$  durch desulfuriertes ABA3.** Je 20 µl der Sulfurierungsreaktionen wurden auf einem 7,5%igen PA-Gel aufgetrennt und mit Indol-3-Carboxaldehyd als Substrat angefärbt (Rkt. 1: AO -Kontrolle ohne ABA3; Rkt. 2: AO + desulfuriertes ABA3; Rkt. 3: AO + desulfuriertes ABA3 + 1 mM L-Cystein).

## 2.5. Untersuchungen zur Regulation von *aba3*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte neben der Analyse der molekularen und biochemischen Eigenschaften der Moco-Sulfurase ABA3 aus *Arabidopsis* auch ein erster Einblick in die *in vivo*-Regulation dieses Gens bzw. Proteins gewonnen werden. Da besonders die von ABA3 aktivierten AOs recht vielfältiger und unterschiedlicher Regulation, ausgelöst z. B. durch Trockenheit, Salz oder Kälte, unterliegen, wurde neben der Expression von *aba3* unter normalen Bedingungen auch die *aba3*-Transkription im Hinblick auf diverse Umwelteinflüsse untersucht.

### 2.5.1. Untersuchung der Transkription von *aba3* unter Standard-Kulturbedingungen

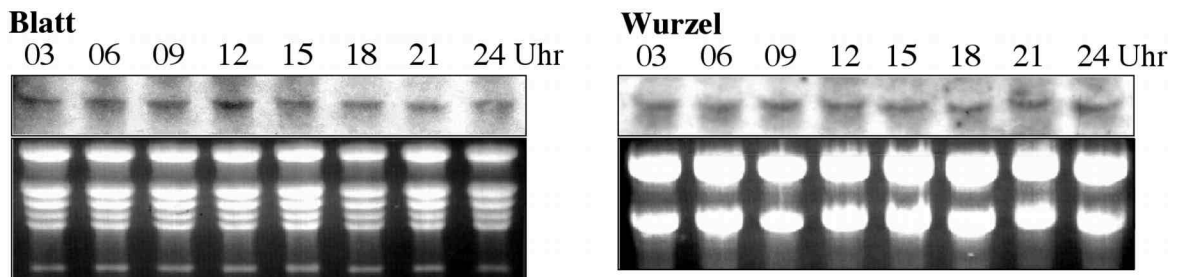
Zu einer ersten Charakterisierung des Transkriptionsmusters eines Gens gehört die Untersuchung der Expression in verschiedenen Geweben der Pflanze und zu verschiedenen Tageszeiten. Da für *aba3* ein „single copy-locus“ festgestellt werden konnte, ist zu erwarten, daß es zu einer ubiquitären Expression des Gens kommt, wie es für solche Gene typisch ist. Tatsächlich wird *aba3*, wie die Abbildung 2.39 zeigt, unter normalen Anzuchtbedingungen in allen getesteten Geweben exprimiert. Allerdings kommt es in den Blüten von *Arabidopsis* nur zu sehr schwacher Expression, wohingegen die Transkription in Wurzeln, Blättern und Stengeln ähnlich stark ist.



**Abb. 2.39: Northern-Analyse der Transkription von *aba3* in verschiedenen Geweben von *Arabidopsis*.** Je 20 µg gesamt-RNA wurden mit der full-length-cDNA als Sonde unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

Für die Analyse einer eventuell von der Tageszeit abhängigen Expression wurden über 24 h hinweg zu verschiedenen Zeitpunkten Blatt- bzw. Wurzelproben entnommen und für die Northern-Analyse vorbereitet. Hierzu wurden Pflanzen aus Erdkulturen verwendet, die unter

Standardbedingungen mit 16 h Licht-Phase kultiviert wurden. Die Abbildung 2.40 legt dar, daß es offenbar zu keiner signifikanten Änderung der Expression von *aba3* in Abhängigkeit von der Tageszeit kommt. Allerdings sollte angemerkt werden, daß stets der 12 h-Wert der Blatt-RNA in allen voneinander unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen RNA-Proben auf eine leichte Steigerung der Expression zu diesem Zeitpunkt, also 5 h nach Beginn der Lichtphase, schließen ließ.

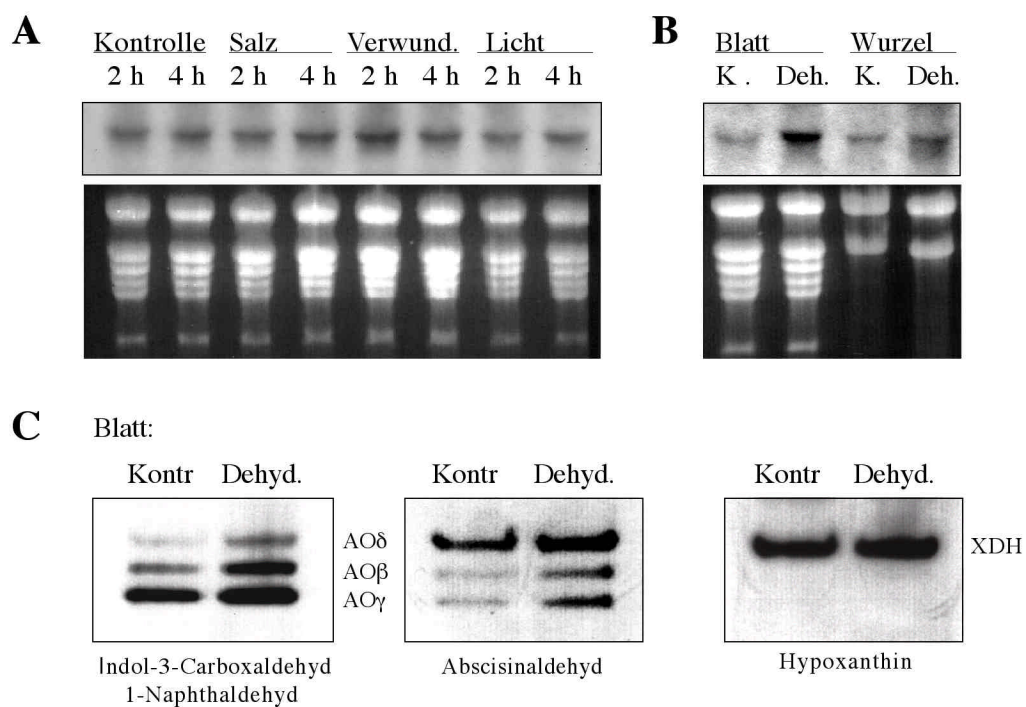


**Abb. 2.40: Northern-Analyse der Tageszeit-abhängigen Expression von *aba3* in Blättern und Wurzeln.** Je 20 µg gesamt-RNA wurden mit der markierten "full-length"-cDNA von *aba3* hybridisiert. Das geerntete Material stammt von Pflanzen, die einer Licht-Phase zwischen 07.00 und 23.00 Uhr ausgesetzt waren.

### 2.5.2. Abhängigkeit der *aba3*-Expression von verschiedenen Stressen

Nachdem festgestellt wurde, daß die Expression von *aba3* unter normalen Umständen keinen nennenswerten Schwankungen unterliegt, sollten *Arabidopsis*-Pflanzen auf verschiedene Weisen solchen Stressen ausgesetzt werden, auf die auch Aldehydoxidasen mit verstärkter Expression bzw. Aktivität reagieren. Hierfür kamen Stresse wie erhöhte Salzkonzentrationen und Trockenheit in Betracht (Seo & Koshiba, 2002). Da eine Beteiligung von ABA und somit von Aldehydoxidasen an der pflanzlichen Streßantwort bei Verwundung und erhöhten Lichtintensitäten nicht unwahrscheinlich ist, wurden die Pflanzen auch auf eine Reaktion der *aba3*-Expression diesbezüglich untersucht. Wie sich dabei herausstellte, bewirken die Zugabe von 200 mM NaCl, gesteigerte Lichtintensitäten von 300 µEinstein anstelle von 100 µEinstein sowie Verwundung durch Punktierung der Blätter 2h bzw. 4 h nach Einsetzen des jeweiligen

Stresses keine bzw. kaum eine Erhöhung der *aba3*-Transkription (Abb. 2.41 A). Eine signifikante Steigerung der Transkription von *aba3* konnte allerdings nach Einsetzen eines Trockenstresses in Blättern nach einem Frischgewichtsverlust von ca. 50% gefunden werden (Abb. 2.41 B). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß die Induktion von *aba3* mit verstärkten Aktivitäten der *Arabidopsis*-Aldehydoxidasen AO $\delta$ , AO $\beta$  und AO $\gamma$  in Rosetten-Blättern von adulten Pflanzen einhergeht (Abb. 2.41 C). Die Aktivität der XDH bleibt hingegen unverändert.



**Abb. 2.41: Expression von *aba3* in *Arabidopsis thaliana* unter verschiedenen Stressen.** (A) Expression von *aba3* in Blättern, 2h und 4h nach Exposition von jeweils 5 Einzelpflanzen unter Salzstreß-Bedingungen (200 mM NaCl) bzw. nach Verwundung durch Punktierung bzw. nach Exposition unter 300  $\mu$ E Starklicht. (B) Expression von *aba3* in Blättern und Wurzeln, 4h nach Exposition von jeweils fünf aus der Anzuchterde herauspräparierten Einzelpflanzen unter Normal- und Trockensteß-Bedingungen. Jeweils 20  $\mu$ g gesamt-RNA wurden mit der Fluoreszin-markierten "full-length"-cDNA von *aba3* hybridisiert. (C) AO- und XDH-Aktivitäten in Blättern derselben Pflanzen wie in (B). Links: AO-Aktivitäten nach Färbung mit Indol-3-Carboxaldehyd und 1-Naphthaldehyd als Substrat; Mitte: AO-Aktivitäten nach Färbung mit Abscisin-Aldehyd; Rechts: XDH-Aktivität nach Färbung mit Hypoxanthin als Substrat. Für die Aktivitätstests wurden jeweils 80  $\mu$ g Protein-Rohextrakt eingesetzt (Deh./Dehyd. = dehydriert für 4 h; K./Kontr. = Kontrolle).

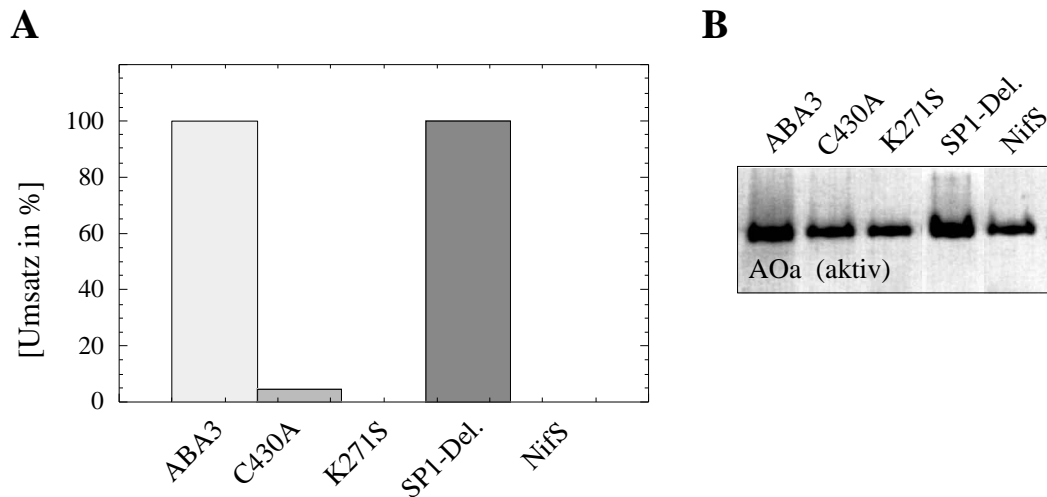
## 2.6. Gezielte Mutagenese von ABA3

Um die genauen Funktionen einiger ausgesuchter Bereiche innerhalb eines Proteins zu charakterisieren, können diese Bereiche durch gezielte Aminosäure-Austausche oder Deletionen so modifiziert werden, daß sie die ehemals vorhandenen Eigenschaften des Proteins verändern. Über die Art der Veränderung, in der Regel ein Verlust einer oder mehrerer Eigenschaften des Proteins, kann der mutagenisierte Bereich funktionell genauer beschrieben werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige der bereits erwähnten und beschriebenen Signaturen ausgewählt, um auf diese Weise eingehender analysiert zu werden. Zunächst sollten möglicherweise essentielle Motive wie das PLP-Bindungsmotiv am Lysin271 und das für die Persulfid-Bindung verantwortliche konservierte Cystein430 mutagenisiert werden, um die Auswirkungen auf die Cystein-Desulfurase-Aktivität von ABA3 studieren zu können. Hierzu wurden die Mutanten K271S und C430A hergestellt. Ob das Protein in zwei vollständig voneinander unabhängige Domänen unterteilt werden kann, sollte die Klonierung der N-terminalen NifS-Domäne von 437 aa zeigen, innerhalb derer alle für die Cystein-Desulfurase-Aktivität notwendigen Strukturen vermutet wurden. Und schließlich sollte durch partielle Deletion der Signal-Peptidase-Signatur am C-Terminus des Proteins (SP1-Del.) die eventuell stattfindende autokatalytische Spaltung von ABA3 untersucht werden.

Nach Ni-NTA-Aufreinigung der Proteine blieb das im PLP-Motiv mutagenisierte ABA3 (K271S) bereits farblos, was tatsächlich als starkes Indiz für eine PLP- bzw. Chromophor-Bindung am Lysin271 gewertet werden konnte. Alle anderen mutagenisierten Proteine wiesen nach wie vor die für ABA3 typische Gelbfärbung auf, das 437 aa große NifS-Fragment jedoch mit verminderter Intensität. Die Untersuchung der Cystein-Desulfurase-Aktivitäten der einzelnen mutierten Proteine zeigte, daß die Persulfid-Bindungs-Mutante C430A noch eine Restaktivität besitzt, die PLP-Bindungs-Mutante K271S und das NifS-Fragment aber keine nachweisbare Cystein-Desulfurase-Aktivitäten mehr aufweisen. Die partielle Deletion der Signal-Peptidase-Signatur (SP1-Del.) hat offensichtlich keinen Einfluß auf die Cystein-Desulfurase-Aktivität (Abb. 2.42 A). Dasselbe Ergebnis wurde bei der Untersuchung der Moco-Sulfurierungs-Aktivität im AO-Rekonstitutions-Assay erzielt (Abb. 2.42 B): Während die SP1-Del.-Mutante die rekombinante AO uneingeschränkt zu sulfurieren vermag und die Mutante C430A noch eine schwache Moco-Sulfurase-Aktivität aufweist, fehlen der Mutante K271S und dem NifS-Fragment diese Aktivität völlig. Dabei konnte beobachtet werden, daß die verbleibende Cystein-Desulfurase-Aktivität der Mutante C430A gegenüber dem Wildtyp in der gleichen

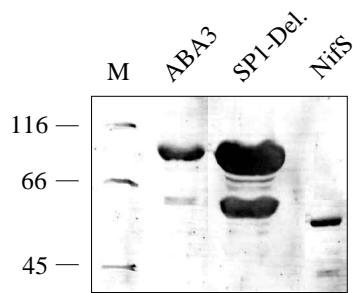
Größenordnung liegt, wie die verbleibende Moco-Sulfurase-Aktivität. Dies mag als zusätzlicher Beweis dafür gewertet werden, daß die Moco-Sulfurierungs-Aktivität unter anderem wesentlich durch die Persulfid-Bindung bestimmt wird.



**Abb. 2.42: Aktivitäten der mutagenisierten ABA3-Proteine ABA3/K271S, ABA3/C430A, ABA3/NifS und ABA3/SP1-Del.** (A) Cystein-Desulfurase-Aktivität und (B) Moco-Sulfurierungs-Aktivität der mutagenisierten Proteine im Vergleich zum Wildtyp. Für (A) wurden jeweils 50 µg affinitäts-, Anionenaustauscher- und Gelfiltration-gereinigtes Protein in einem Volumen von 420 µl Tris-HCl, pH 8,0 mit 1mM L-Cystein und 1 mM DTT eingesetzt. Für (B) wurden jeweils 20 µg affinitätsgereinigte aktive AO und jeweils 20 µg der mutagenisierten ABA3-Proteine aus (A) in einem Volumen von 250 µl Tris-HCl, pH 8,0 mit 1mM L-Cystein für 2h bei 30 °C inkubiert. Je 20 µl davon wurden auf ein natives 7,5% PA-Gel aufgetragen und nach Elektrophorese mit Indol-3-Carboxaldehyd als Substrat gefärbt.

In einer Western-Analyse der mutagenisierten Proteine konnte gezeigt werden, daß durch die partielle Deletion der Signal-Peptidase-Signatur (SP1-Del.) eine Spaltung des rekombinanten Proteins nicht unterbunden wird (Abb. 2.43). Die Spaltung des rekombinanten Proteins muß demnach auf einen Effekt in *E. coli* zurückgeführt werden. Nach wie vor kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß *in vivo* eine spezifische, autokatalytische Spaltung des Proteins unter bestimmten Bedingungen in zwei Domänen stattfindet.

Darüber hinaus legt die Western-Analyse dar, daß die Masse der rekombinanten NifS-Domäne von 437 aa mit ca. 55 kDa nicht exakt mit der des ABA3-Spaltproduktes von ca. 60 kDa übereinstimmt. Dies mag als weiteres Indiz für eine unspezifische, in *E. coli* stattfindende Spaltung des "full-length" Proteins gewertet werden.



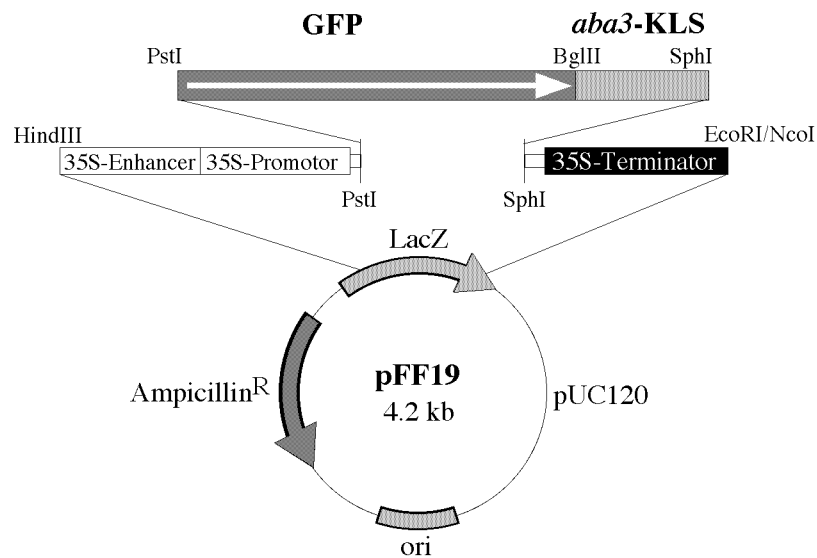
**Abb. 2.43: Western-Analyse der mutagenisierten ABA3-Proteine.** Je 5 µg rekombinantes Protein wurden im 10%igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und mit Anti-His-Tag-Antikörpern detektiert (M = Marker; ABA3 = nicht-mutagenisiertes Kontroll-Protein; SP1-Del. = rekombinantes ABA3 mit partieller Deletion der Signal-Peptidase-Signatur; NifS = rekombinante, N-terminale Domäne von ABA3 mit einer Größe von 437 aa).

## 2.7 Untersuchung zur Kernlokalisierung von ABA3

In ersten Versuchen zum Nachweis einer zumindest zeitweiligen Lokalisierung von ABA3 im Kern sollte mit einem GFP (Green Fluorescent Protein)-Fusionskonstrukt durch transiente Transformation von Tabak-Blättern (*Nicotiana tabacum*) mittels Partikel-Kanonen-Beschuß erfolgen. GFP-Konstrukte sind hierfür erfahrungsgemäß gut geeignet und durch Fluoreszenz-Mikroskopie leicht nachzuweisen. Im Falle der Transformation einer von zwei Schließzellen einer Spaltöffnung bietet sich zudem die Gelegenheit, die zweite Schließzelle des Paares als Negativ-Kontrolle zu nutzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu ein bereits bestehendes Konstrukt, der Vektor pFF19/GFP (Timmermans *et al.*, 1990) so verändert, daß die Einklonierung des 3'-Bereiches der *aba3*-cDNA mit dem Kernlokalisierungs-Signal (KLS) im selben Leserahmen wie die GFP-cDNA ermöglicht wurde. Im hierdurch erhaltenen neuen Konstrukt pFF19/GFP-KLS wurde somit das Kernlokalisierungs-Signal von ABA3 an den C-Terminus des GFP-Proteins fusioniert (Abb. 2.44).

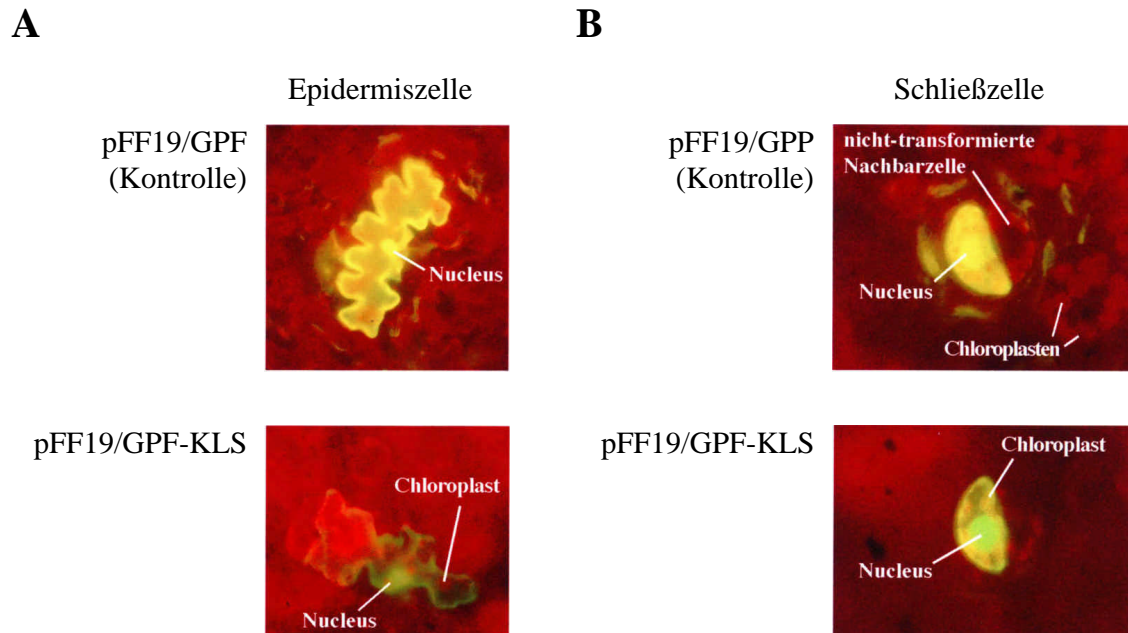




**Abb. 2.44: Verwendetes Konstrukt zum Nachweis der Kernlokalisierung von ABA3.** In den von Timmermans *et al.* (1990) erzeugten Vektor pFF19/GFP (Basisvektor ist der pUC120) wurde nach Ersetzen des GFP-Stop-Codons durch eine BglII-Site der 3'-Bereich von *aba3* mit einer Länge von 159 bp im selben Leserahmen eingefügt. Innerhalb dieses Bereiches ist das vollständige putative Kernlokalisierungs-Signal enthalten (*aba3*-KLS = *aba3*-Kernlokalisierungs-Signal; ori = origin of replication; LacZ = -Galaktosidase-Gen).

Ein bzw. zwei Tage nach Beschuß der Tabak-Blätter mit Vektor-DNA-beladenen Goldpartikeln wurden die entsprechenden Blätter auf die Expression von GFP hin untersucht. Wie die Abbildung 2.45 zeigt, kann sowohl in Epidermis- als auch in Schließzellen bereits ohne Kernlokalisierungs-Signal eine deutlich sichtbare Lokalisierung des GFP-Proteins im Kern durch dessen gelbliche Fluoreszenz ausgemacht werden. Grebenok *et al.* (1997) bezeichneten dies als ein passives und reversibles Phänomen, das dem GFP-Protein aufgrund seiner relativ geringen Größe von 26 kDa zu eigen ist. Das mit dem Kernlokalisierungs-Signal von ABA3 fusionierte GFP findet sich jedoch in signifikant geringerer Konzentration im Cytosol, wodurch die gesamte Zelle transparenter erscheint. Dies wird wahrscheinlich durch einen verstärkten Eintransport des GFP-Proteins in den Kern bewirkt, so daß der Kern, vor allem in Schließzellen (Abb. 2.45 B), gleichzeitig um so intensiver hervortritt. Es sollte aber angemerkt werden, daß der eindeutige Nachweis der Kernlokalisierung von ABA3 mit mehreren Schwierigkeiten verbunden sein dürfte. So darf zum einen nicht angenommen werden, daß ABA3 zu jedem Zeitpunkt und in seiner Gesamtheit im Kern präsent ist, da die Hauptfunktion von ABA3, die Sulfurierung von AO und XDH, im Cytosol stattfindet. Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß die Spaltung des ABA3-Proteins in seine Domänen die Voraussetzung für den Eintransport der

Transkriptionsfaktor-Domäne von ABA3 in den Kern ist. Ebenso sind die Bedingungen, die eventuell zur Lokalisierung von ABA3 oder dessen C-terminaler Domäne in den Kern führen, nicht bekannt.



**Abb. 2.45: Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme von Zellen in transient transformierten Tabak-Blättern.** (A) Epidermiszellen und (B) Schließzellen zwei Tage nach Transformation mit dem Kontroll-Konstrukt pFF19/GFP (oben) bzw. mit dem Fusionskonstrukt pFF19/GFP-KLS zum Nachweis der Lokalisierung von ABA3 (unten).

Versuche mit Konstrukten, bei denen das GFP an das 3'-Ende der vollständigen *aba3*-cDNA fusioniert wurde, erbrachten weder nach transienter Transformation von Tabak noch nach stabiler Transformation von *Arabidopsis* andere Ergebnisse als das jeweilige Kontroll-Konstrukt. Allerdings könnte in weiterführenden Arbeiten mit Hilfe der stabilen transgenen Linien nach Bedingungen gesucht werden, die den Eintransport von ABA3 in den Kern bewirken.

### 3. Diskussion

#### 3.1. Die pflanzliche Moco-Sulfurase ABA3 aus *Arabidopsis thaliana*

Basierend auf Homologien zu den bereits vor Beginn dieser Arbeit beschriebenen putativen Moco-Sulfurasen Ma-1 aus *Drosophila melanogaster* und HxB aus *Aspergillus nidulans* sowie zu der im Verlauf dieser Arbeit veröffentlichten Moco-Sulfurase MCSU aus *Bos taurus* (Watanabe *et al.*, 2000) wurde eine cDNA der pflanzlichen Moco-Sulfurase *aba3* aus *Arabidopsis thaliana* isoliert. Die mit einem offenem Leserahmen von 2457 bp für ein 819 aa großes Protein kodierende cDNA besteht aus 21 Exons, wie nach Vergleich mit dem korrespondierenden genomischen Bereich festgestellt werden konnte. Die Zahl der Exons bzw. Introns ist dabei für *Arabidopsis* bereits ungewöhnlich hoch. Zwar sind Gene mit bis zu 78 Introns bekannt, jedoch stellen diese die absolute Ausnahme dar, da die Mehrheit aller ca. 25.500 *Arabidopsis*-Gene durchschnittlich 5,2 Introns beinhaltet (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Hierfür könnte evtl. ein gemeinsamer Ursprung und eine konservierte Struktur aller Moco-Sulfurase-Gene verantwortlich gemacht werden. Bei einem Vergleich mit anderen putativen Moco-Sulfurasen wird jedoch klar, daß die Exon/Intron-Strukturen nur sehr schwach konserviert sind. So besteht die *hxB*-cDNA aus zwei Exons und die *ma-1*-cDNA aus vier Exons (Amrani *et al.* 2000), während die cDNAs aus Rind und Mensch (Watanabe *et al.*, 2000; Ichida *et al.*, 2001) jeweils 15 untereinander sehr stark konservierte Exons besitzen. Unter allen genannten Moco-Sulfurasen ist lediglich die Position des ersten Introns konserviert, während weitere konservierte Intronpositionen nur noch zwischen den Säuger-Sulfurasen und *aba3* auftreten. Hier scheinen jeweils die ersten drei und die letzten drei Introns an entsprechend gleicher Stelle positioniert. Das könnte darauf hindeuten, daß Säuger und Pflanzen einen gemeinsamen Vorläufer haben, der sich aber aufgrund unterschiedlicher Selektionsdrücke in beiden Gruppen unterschiedlich weiterentwickelt hat. Diese Hypothese wird auch durch die deutlich stärkeren Homologien des ABA3-Proteins zu seinen Säuger-Homologen HMCS und MCSU, verglichen mit Ma-1 und HxB, gestützt. Allen bisher beschriebenen Moco-Sulfurasen ist jedoch gemein, daß das Gen der Moco-Sulfurase im jeweiligen Genom nur einmalig auftritt, also einen "Single Copy Locus" repräsentiert. Partielle Duplikationen des Gens wurden lediglich beim Menschen gefunden und betreffen die Exons 7 und 11, die in unmittelbarer Nachbarschaft zum *hmcs*-Gen auf Chromosom 18q12+1 stromabwärts des Gens dupliziert vorliegen. Auch verwandte Proteine, mit

einer ähnlichen Struktur wie Moco-Sulfurasen, tauchen im Proteom keines der genannten Organismen auf. Signifikante Homologien von Moco-Sulfurasen zu anderen Proteinen desselben Organismus treten lediglich über die NifS-Domäne auf und betreffen die sogenannten Cystein-Desulfurasen, die bedingt den NifS-ähnlichen Enzymen zugeordnet werden können. Die Sequenzhomologien deuten ähnliche Funktionen bereits an: Cystein-Desulfurasen und Moco-Sulfurasen mobilisieren Schwefel aus Cystein, den es auf andere Moleküle zu übertragen gilt. Weitere, jedoch nicht sehr starke, Homologien treten im C-terminalen Bereich der Moco-Sulfurasen zu Proteinen mit unbekannter Funktion auf. Insgesamt wird deutlich, daß Moco-Sulfurasen keiner anderen Gen- oder Protein-Familie zugeordnet werden können, außer man wagt die Einteilung über die N-terminalen Domänen zu den Cystein-Desulfurasen.

### 3.1.1. Vergleich von ABA3 mit anderen pflanzlichen Moco-Sulfurasen

Da zum gegenwärtigen Zeitpunkt außer ABA3 aus *Arabidopsis* keine weiteren pflanzlichen Moco-Sulfurasen beschrieben sind, wurden für einen Vergleich sogenannte ESTs (Expressed Sequence Tags) herangezogen. ESTs repräsentieren jedoch nur einen relativ kurzen Nukleinsäure-Abschnitt eines unbekannten cDNA-Fragments, welches willkürlich auf einer Seite ansequenziert und anschließend direkt ohne weitere Nachbearbeitung in das Datennetz gestellt wird. Entsprechend kurz fällt daher die anhand des ESTs erhältliche Peptid-Sequenz aus. Sie ist in der Regel dennoch geeignet, den Grad der Homologie zu einem verwandten Protein zu bestimmen. In dieser Arbeit konnten mit Hilfe der Nukleinsäure-Sequenz von *aba3* einige pflanzliche ESTs gefunden werden, die nach Translation in ihre entsprechende Peptid-Sequenz sehr starke Homologien zu ABA3 aufwiesen (Abb. 3.1). Dabei fanden sich sowohl Vertreter der Monokotyledonen (*Sorghum bicolor*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*) als auch der Dikotyledonen (*Solanum tuberosum*, *Glycine max*, *Medicago truncatula*) mit jeweils ähnlichen Homologien von 80% bis 92% zu ABA3. Dies kann daher zumindest als Hinweis auf eine starke Konservierung aller Moco-Sulfurasen von krautigen Pflanzen gewertet werden und deutet ebenso auf eine strikte Konservierung des von ihnen katalysierten Mechanismus hin. Da bisher jedoch weder Informationen über baumartige noch über submerse oder niedere Pflanzen vorliegen, können diese bei einer solchen Beurteilung nicht berücksichtigt werden.

*Sorghum bicolor* (Hirse; GenBank AW671539); Homologie 81%:

ABA3 VKKKLQALRHGNGAAVCLVYGSSENLELSSHKSGPTVTFTNLKRPDGSWFGYLEVEKLASLS 420  
 Sorghum GRNMKLELKHNNEKNVCI IYG-QASKANYLKMGP TITFTNLKREDGTWFGYREVEKLASLS 61  
 :\*: \*:\*. \* \*:\*: \* : : . \* \*:\*:\*\*\*\*\* \*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

ABA3 GIQLRTGCF CNPGACAKYLELSHSELRSNVEAGHICWDDNDVINGKPTGAVRV SFGYMST 480  
 Sorghum GIHLRTGCF CNPGACAKYVGLSHSDLVSNFEAGHVCWDDNDI INGKPTGAVRISFGYMST 121  
 \*:\*\*\*\*\*: \*:\*: \* \*. \*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

ABA3 FEDAKKFIDFI ISSFASPPKKTGNGTVVSGRFPQLPSEDLESKESFP SHYLKSITVYPIK 540  
 Sorghum YEDAEFLKFLQSSFVSKPVGLKNGYMNVTDTFTNLVDD--WRQQAISDIRLKSITIYPVK 179  
 :\*:\*:\*:\*. \*: \*. \* \*: \* :\* .: :\*:.. \*\*\*\*\*:\*\*\*

*Oryza sativa* (Reis; GenBank AU030734); Homologie 89%:

ABA3 MRNTSKLQKEESRGNAYNLFAFPSECNFSGLRFNLDLVKLMKENTETVLQGSFPFSKSKRW 240  
 Oryza -----G-----KW 3  
 \*

ABA3 MVLIDAAKGCATLPPDLSEYPADFVVL SFYKLFGYPTGLGALLVRNDAAKLLKKT YFSGG 300  
 Oryza MVLIDAAKGCATEPPNLTVPADFVVSFYKIFGYPTGLGALIVKNEAANLLNKTYFSGG 63  
 \*\*\*\*\* \*:\*: \*\*\*\*\* \*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*

ABA3 TVAASIADIDFVKRRERVEEFFEDGSASFLSIAAIRHGFKLLKSLTPSAIWMHTTSLSIY 360  
 Oryza TVAASIADIDFVQKRKNIEQVLED----- 87  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*:\*. \* \*:\*\*\*

*Triticum aestivum* (Weizen; GenBank BE404285); Homologie 92%:

ABA3 VKKKLQALRHGNGAAVCLVYGSSENLELSSHKSGPTVTFTNLKRPDGSWFGYLEVEKLASLS 420  
 Triticum1 -----KVADLKTSPTITFTNLKREDGTWFGYREVEKLASLS 37  
 :\*: \*. \*:\*\*\*\*\* \*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

ABA3 GIQLRTGCF CNPGACAKYLELSHSELRSNVEAGHICWDDNDVINGKPTGAVRV SFGYMST 480  
 Triticum1 GIHLRTGCF CNPGACAKYLGLSHSDLVSNFEAGHVCWDDNDVIKGKPTGAVRISFGYMST 97  
 \*:\*\*\*\*\*: \*:\*: \* \*. \*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

ABA3 FEDAKKFIDFI ISSFASPPKKTGNGTVVSGRFPQLPSEDLESKESFP SHYLKSITVYPIK 540  
 Triticum1 YQDAEFLKFLQSSFVSKPIASSNGHALS----- 126  
 :\*:\*:\*:\*. \*: \*. \* :\*. \* :\*

*Triticum aestivum* (Weizen; GenBank BE419082); Homologie 80%:

ABA3 KDCLNRNKSPGLCRDLESNINFANEAQFL LISEESVADLNRRLEAKDEDYKRAHEKLNPH 720  
 Triticum2 HECTSTGKNGRLCRDTRSKLSFVNEGQLLLISEESVSDLNSRLSSSNGNGK-QHVLVDAM 59  
 :\*: . \*. \* \*:\*. \* \*:\*\*\*\*\*:\*\*\* \*:\*. : \* \* :\*

ABA3 RFRPNLVISGGEPYGEDKWKTVKIGDNHFTSLGGCNRCQMINISNEAGLVKKSNEPLTTL 780  
 Triticum2 RFRPNLVISGSTPYREDNWKRLHIGDAYFTSMGGCNRCQMINLHQNAGQVIKSKEPLATL 119  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*. \* \*:\*\*\* :\*: \* \*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\* \* \*:\*\*\*:\*\*\*

ABA3 ASYRRVKGKILFGTLLRYEIDEK-----RQCWIGVGEEVNPDI E 819  
 Triticum2 ASYRREKGKILFGVLLNYEDGLSGGEETVAERWLQVGQEVHASTE 164  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*.\*. \* . : \*:\*\*\*\*\*:.. \*

**Solanum tuberosum (Kartoffel; GenBank BE921622); Homologie 83%:**

ABA3	GIQLRTGCFCNPGACAKYLELSHSELRSNVEAGHICWDDNDVINGKPTGAVRVSFQGYMST	480
Solanum	-----DILHGKPTGAVRVSFQGYMST	20
	*:::*****	
ABA3	FEDAKKFIDFIISSFASPPKKTGNGTVVSGRFPQLPSEDLESKESFSPSHYLSITVYPIK	540
Solanum	FEDAMKLVNFVENNFVIT---SSNRCALQPSSISLPIEGIAKAAAR--HFLSSITVYPIK	75
	**** *:***: ..* . :.* .. .** *: . : *:.******	
ABA3	SCAGFSVIRWPLCRTGGLLDREWMVQGLTGEILTQKKVPMSLIKTFLDLEEGLLSVES	600
Solanum	SCAGFSVDQWPLTSTGGLLDREWLKSTTGEILTQKKVPMECYISTLIDLNLGKLFVES	135
	***** :*** *****:.. ***** . *:***: * * *	
ABA3	RCEDKLHIRIKSDSYNPRNDEFDSHANILENRNEETRINRWFNTAIGRQCKLLRYSSSTS	660
Solanum	RCKEKLQIELKSNSLVAGRDEMDIQNHRYEVRSYNNEVDIWFSTRADRPCTLLRNSSSQS	195
	**::***:.*:***: . .*: * : : * * . :..: **:.**.* *.*** ** *	
ABA3	KDCLNRNKSPGLCRDLESNINFANEAQFLLISEESVADLNRRLEAKDEDYKRAHEKLNPH	720
Solanum	HSCINKNGSPGMCRDVGA-----	213
	:.***: * **::***: :	

**Glycine max (Soja; GenBank AW509025); Homologie 89%:**

ABA3	TVAASIADIDFVKRRERVEEFFEDGSASFLSIAAIRHGFKLLKSLTPSAIWMHTTSLSIY	360
Glycine	-----KRREGIEELFEDVTVSFLSIVSIRHGFKILNSLTVSAISRHIASLALY	48
	**** :*:*** : .*****:*****:***:*** * * :***:*	
ABA3	VKKKLQALRHGNGAAVCVLYGSENLELSSHKSGPTVTFNLKRPDGSWFGYLEVEKLASLS	420
Glycine	TRKMLLAMRHGNGSSVCILYGHHSMLKCHEMGPPIISFNLKRPDGSWYGYREVEKLASLS	108
	.* * *:*****:***:*** . * .*: ** :*****:*** *****	
ABA3	GIQLRTGCFCNPGACAKYLELSHSELRSNVEAGHICWDDNDVINGKPTGAVRVSFQGYMST	480
Glycine	GIQLRTGCFCNPGACAKYLGLSHLDLISNTEAGHVCWDDLDIINGKPVGAVRVSFQ---	164
	***** ***** * * : * ** .*****:***** *:***** .*****	

**Medicago truncatula (Schneckenklee; GenBank BE320130); Homologie 80%:**

ABA3	SCAGFSVIRWPLCRTG-LLHDREWMVQGLTGEILTQKKVPMSLIKTFLDLEEGLLSVES	599
Medicago	-----LSNNGSLKHDREWILKSLSGEILTQKVPMEGLISSFIDLSQGMFLVES	49
	*..* * *****:..***** *:***** .** .:***:.*:*** ** *	
ABA3	SRCEDKLHIRIKSDSYNPRNDEFDSHANILENRNEETRINRWFNTAIGRQCKLLRYSSST	659
Medicago	PHCKERLQIRLQLDFYDSAIQDIELQGQRYKVYSYDNETNSWFKAIERPCTLLRYSGSS	109
	.*:***:***: * *: . : : : : . :.. * **::** * *.*****.*:	
ABA3	SKDCLNRNKSPGLCRDLESNINFANEAQFLLISEESVADLNRRLEAK-DEDYKRAHEKLN	718
Medicago	HDFVLDRTKDIVTCKDTNSAVSFANEGQFLLVSEESVSDLNKRLCSDVQMDMCETEIEIN	169
	. *:.*. *: * :.*****:*****:*****:***: * : : * ..:***	
ABA3	PHRFRPN-LVISGGEPEYGEDKWKTVKIGNHFTSLGGCNRCQMINISNEAGLVKKSNEPL	777
Medicago	TNRFRPNPCGILEADPYDEDGME-----	192
	:.***** * .:***:*** :	

**Abb. 3.1: Alignment der aus den EST's resultierenden Peptide gegen die entsprechenden Regionen von ABA3.** Die Homologien wurden bestimmt zwischen der ersten und der letzten Aminosäure eines jeden EST's. Die GenBank Accession-Nummern repräsentieren den ursprünglichen EST mit seiner jeweiligen Nukleinsäure-Sequenz (\* = identische Positionen; : = stark konservierte Positionen; . = schwach konservierte Positionen).

### 3.1.2. Die genomische Umgebung von *aba3*

Die mittlerweile fast vollständige Sequenzierung und Annotierung des *Arabidopsis*-Genoms bot die Möglichkeit, das *aba3*-Gen in ausführlicher Weise in einen genomischen Kontext einzubetten. So hatten frühere Kartierungsexperimente mit den Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* die Lokalisierung des *aba3*-Locus auf Chromosom 1 bei ca. 14 cM vorausgesagt (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996), was im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Der das gesamte *aba3*-Gen enthaltende BAC-Klon F19K19/AC011808 konnte durch Vergleich mit Klonen bekannter Positionen bei ca. 17 cM kartiert werden. Die Unterschiede der vorausgesagten und der ermittelten Position liegen in der unterschiedlichen Bestimmungsweise begründet. So wurde der *aba3*-Locus in den Mutanten mit Hilfe klassischer Rückkreuzungen bestimmt, wohingegen die Position des Klones F19K19 durch Datenbank-Analyse festgelegt wurde. Die Abweichung von ca. 3 cM kann dabei sogar als außerordentlich gering angesehen werden, wie Vergleiche von klassisch und "elektronisch" bestimmten Positionen anderer Gene gezeigt haben. Die Möglichkeit, auf das fast vollständige Genom von *Arabidopsis* zurückgreifen zu können, erbrachte ferner nach der Southern-Analyse den finalen Beweis des Vorliegens von *aba3* in einem "Single Copy Locus". Weder das *aba3*-Gen noch ein Fragment dessen finden sich an anderer Stelle im Genom wieder. Dies deutet unter anderem auch darauf hin, daß das *aba3*-Gen von Duplikationen verschont geblieben ist, die ansonsten sehr häufig im Verlauf der Evolution von *Arabidopsis* stattgefunden haben (Vision *et al.*, 2000). Für den Bereich unmittelbar vor dem 5'-Ende des *aba3*-Gens, den putativen Promotor, trifft dies hingegen nicht zu. Fragmente von bis zu 2,6 kb der den Promotor enthaltenden Region finden sich auf allen fünf Chromosomen wieder, hauptsächlich in Regionen, die keine kodierenden Sequenzen enthalten. Lediglich das gemeinsame Aufkommen einiger weniger *aba3*-Promotor-Duplikationen mit putativen Genen weist auf promotorähnliche Funktionen dieser Abschnitte an anderen Gen-Loci hin. Die Tatsache, daß zwar der Promotorbereich redundant vorliegt, nicht aber das *aba3*-Gen selbst, deutet eine unabhängige evolutive Entwicklung von Gen und Promotor an.

Daß zumindest der basale Promotor tatsächlich in dieser Region lokalisiert ist, zeigen die Komplementationen der Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* mit dem 8,5 kb großen genomischen Fragment, das das gesamte *aba3*-Gen und ca. 1,5 kb der stromaufwärts gelegenen Region enthält. Da hier ohne einen Fremd-Promotor die Wildtyp-Aktivität von AO und XDH wiederhergestellt werden konnte, müssen entsprechende Elemente in dem 1,5 kb-Bereich vorhanden sein. Die datenbankengestützte Analyse dieses Bereiches unterstützt diese

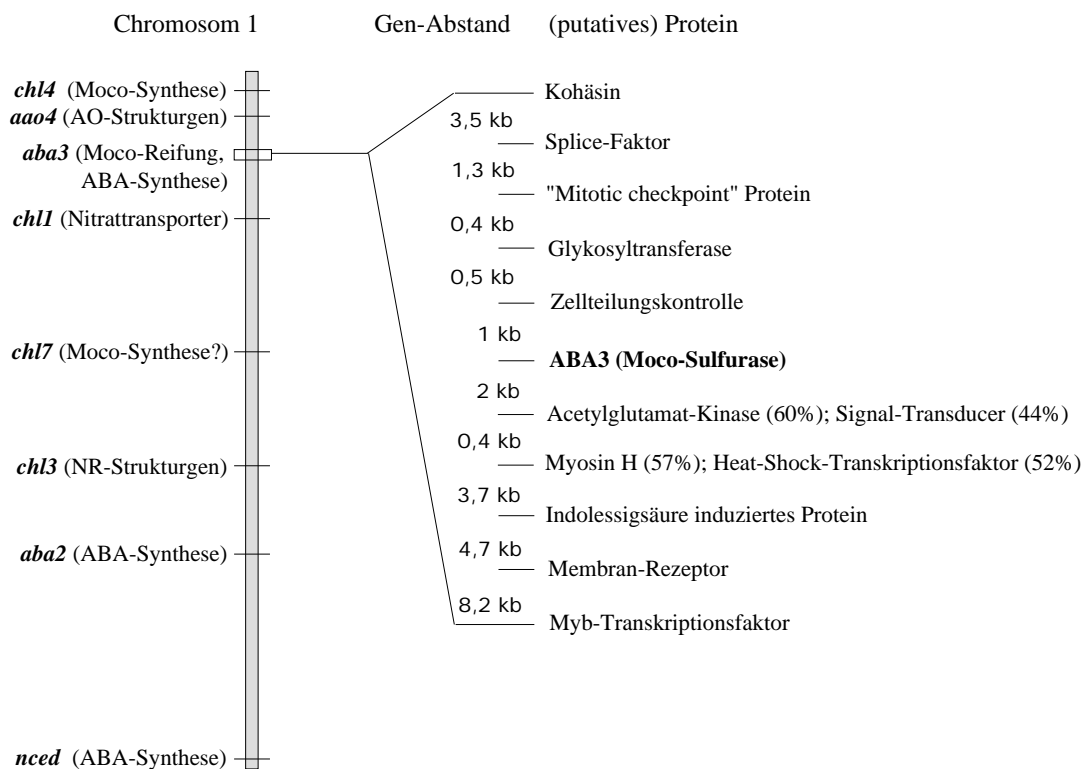
Schlußfolgerung, indem sie das Vorhandensein einer TATA-Box, zweier AGGA-Boxen und eines ABA-Response-Elementes (ABRE) aufzeigt. Allerdings war im Rahmen dieser Arbeit eine gezielte Charakterisierung des Promotors nicht vorgesehen, so daß die einzelnen Elemente sowie evtl. weitere vorhandene auch nicht detailliert untersucht wurden. Es muß zunächst ungeklärt bleiben, ob innerhalb dieser 1,5 kb-Region auch die für die Streßinduktion von *aba3* notwendigen Elemente liegen. Dies deutet sich durch das ABRE-Element zwar an und eine Induzierbarkeit der *aba3*-Expression durch ABA wurde bereits nachgewiesen (Xiong *et al.*, 2001), jedoch könnten noch weitere regulative Sequenzen an anderer Stelle enthalten sein. Hierauf weisen z.B. einige putative Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren mit z.T. Expression-induzierenden und z.T. -reprimierenden Eigenschaften hin. Unter anderem scheint der Faktor GAmYb, der die Gibberellin-induzierte Expression bestimmter Gene steuert, an den *aba3*-Promotor zu binden. Warum aber durch ABA und gleichzeitig durch Gibberelline regulierte Elemente in ein und demselben Promotor auftreten kann ebenfalls zunächst nur vage spekuliert werden. Eine Induktion des *aba3*-Gens, z.B. zur Steigerung der ABA-Synthese, durch Gibberelline erscheint vor jedem physiologischen Hintergrund unsinnig, da beide Phytohormone ansonsten antagonistisch zueinander wirken. Eine Repression von ABA-Synthese-relevanten Genen wie *aba3* durch Gibberelline, z.B. zur Aufhebung der ABA-abhängigen Samen-Dormanz, wäre daher eher zu erwarten.

Bei der Untersuchung der in unmittelbarer Nachbarschaft zu *aba3* lokalisierten Gene konnte beobachtet werden, daß mit auffälliger Häufigkeit Zellteilungs-Kontrollgene und Transkriptionsfaktor-ähnliche Gene auftreten (Abb. 3.2). Hierbei finden sich die Zellteilungsgene in einem Cluster stromabwärts von *aba3*, während die putativen Transkriptionsfaktoren ausschließlich stromaufwärts gelegen sind. Ungewöhnlicherweise liegt die Dichte der Zellteilungsgene mit 1 Gen pro 1,4 kb weit über dem für *Arabidopsis* typischen Durchschnitt von 1 Gen pro 4,5 kb (Vision *et al.*, 2000). Cluster dieser Art legen eine gemeinsame Regulation der beteiligten Gene nahe, so daß sich die Frage stellt, wie *aba3* in diesen Kontext paßt und ob *aba3* überhaupt in dieses Cluster gehört. Da die *aba3* stromaufwärts flankierenden putativen Transkriptionsfaktor-Gene in Abständen von durchschnittlich 3,8 kb aufeinander folgen, kann hier von einer untypischen Gendichte nicht die Rede sein. Das *aba3*-Gen selbst stellt somit die Grenze zwischen diesen beiden Gruppen dar und sollte, wenn überhaupt, aufgrund funktioneller Analogien den putativen Transkriptionsfaktor-Genen gleichgesetzt werden. Regulierende Gene dieser Art befinden sich häufig in genomischen Regionen, die für Transkriptionselemente sterisch besonders gut zugänglich sind. Dies erspart



bzw. erleichtert die aufwendige Dekondensierung des kompakten Chromatins und ermöglicht somit eine wesentlich rascherer Assoziation des immerhin ca. 500.000 Da großen RNA-Polymerase-Komplexes. Auf diese Weise und in einer solchen Region wäre auch für *aba3* eine komplexe und rasche Expression gesichert.

Bezüglich eines eventuellen gemeinsamen Auftretens von *aba3* mit anderen Genen der Moco-Synthese, der ABA-Synthese/-Regulation oder des Purin-Metabolismus konnte aber keine Clusterung solcher Gene gefunden werden, wenn auch auffällig viele dieser Gene über das gesamte Chromosom 1 verteilt sind. Lediglich der in der T-DNA getaggtten Mutante *13.5* betroffenen putativen Cytochrom P450-Monooxygenase könnte aufgrund ihrer fast direkten Nachbarschaft zu *aba3* und aufgrund des Phänotyps der *13.5* ein Zusammenwirken mit *aba3* unterstellt werden. Hierauf soll jedoch in einem anderen Kapitel dieser Arbeit eingegangen werden.



**Abb. 3.2: Schematische Darstellung ausgewählter Bereiche des Chromosoms 1 von *A. thaliana*.** (A) zeigt die Verteilung von ABA- und Moco-relevanten Gen-Loci auf Chromosom 1. (B) repräsentiert einen Ausschnitt von Chromosom 1 mit den 5' und 3' von *aba3* gelegenen Genen (*chl4*: *cnx3*/Moco-Synthese; *aaol*: Aldehydoxidase-Strukturgen AAO4; *aba3*: Molybdän-Cofaktor-Sulfurase; *chl1*: Nitrattransporter; *chl7*: *cnx4*/Moco-Synthese?; *chl3*: *nia2*/Nitratreduktase-Strukturgen; *aba2*: "Short chain"-Dehydrogenase/Reduktase der ABA-Synthese; *nced*: 9-cis-Epoxy-carotinoid-Dioxygenase der ABA-Synthese).

### 3.2. Charakterisierung der *Arabidopsis aba3*-Mutanten

#### 3.2.1. Die Mutanten *aba3.1*, *aba3.2* und *13.5* sind allel

Die molekulare Analyse des *aba3*-Locus zeigte in allen drei putativen *aba3*-Mutanten eine oder gleich mehrere Mutationen auf. So wurde in der *aba3.1* eine G → A-Substitution auf DNA-Ebene nachgewiesen, die einen Austausch des konservierten Glycins an Position 469 gegen eine Glutaminsäure (G469E) bewirkt. Die beiden Mutanten *aba3.2* und *13.5* unterscheiden sich jedoch in der Natur der Mutation von *aba3.1*. Für sie wurde die Mutation einer Spleiß-Stelle bzw. die komplette Deletion einer solchen gezeigt, wodurch nur noch unvollständige Proteine gebildet werden sollten, wenn es überhaupt noch zu einer Translation in diesen Mutanten kommt. Die *aba3.2*-Mutante besitzt darüber hinaus einen weiteren Basenaustausch und eine 1-Basen-Deletion, die jedoch bedeutungslos werden, da sie bei der Verkürzung des Exons 11 mit dem Intron 10 herausgespleißt werden. Im Fall der Mutante *13.5* tritt hingegen die Spleiß-Mutation im *aba3*-Gen neben der T-DNA-Insertion im Cytochrom P450-homologen Gen auf. Die Natur der hier aufgeklärten Mutationen stimmt dabei insgesamt mit den verwendeten Mutagenen sehr gut überein: Ethyl-Methan-Sulfonsäure, das Mutagen im Fall der *aba3.1*, bewirkt üblicherweise einzelne Basenaustausche, eine radioaktive Bestrahlung im Fall der *aba3.2* führte hingegen zu üblichen Mehrfach-Mutationen, die sich neben Austauschen oftmals auch als Einzelbasen-Deletionen manifestieren. Von T-DNA getaggtten Mutanten wie der *13.5* ist mittlerweile bekannt, daß es mit der Transformation des T-DNA Vektors außer zu der gewünschten T-DNA Integration auch zu verschiedenen Genom-Aberrationen kommen kann (Tinland *et al.*, 1996). Üblicherweise gehen diese "Hintergrundmutationen" auf frühzeitig abgebrochene T-DNA Insertionen zurück und äußern sich als kleine Insertionen oder Deletionen. Zu diesen muß letztlich auch das Deletionsereignis im *aba3*-Gen der *13.5*-Mutante gezählt werden, das wahrscheinlich zwar in kausalem Zusammenhang zu der T-DNA Transformation steht, jedoch einen von der nachweisbaren Integration unabhängigen Gen-Locus betrifft. Schließlich darf nicht unberücksichtigt bleiben, daß der Phänotyp der Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* nach stabiler Transformation mit dem kompletten *aba3*-Gen des Wildtyps vollständig restauriert werden konnte. Dies beweist den Ursprung des Phänotyps aus den beschriebenen *aba3*-Mutationen und damit die Funktionalität von ABA3 im Hinblick auf Sulfurierung von AO und XDH sowie die Beteiligung an der ABA-Synthese.

### 3.2.2. Die Mutationen der einzelnen *aba3*-Mutanten manifestieren sich phänotypisch mit unterschiedlicher Stärke

Sowohl für die *aba3.1* als auch für die *aba3.2* und die *13.5* wurden Mutationen in ein und demselben Locus festgestellt. Dennoch unterscheiden sich die Phänotypen der einzelnen Mutanten im Hinblick auf ihren Habitus und ihre biochemischen Merkmale. So konnte zwar in allen drei Mutanten gleichermaßen der Verlust von AO- und XDH-Aktivitäten sowie eine Steigerung der NR-Aktivitäten gegenüber den entsprechenden Wildtypen nachgewiesen werden, jedoch wurde auch gezeigt, daß die NR-Aktivitäten zwischen den Mutanten erheblich differieren. Die Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* verhalten sich mit Werten von ca. 150% NR-Aktivität gegenüber dem jeweiligen Wildtyp noch recht ähnlich, während die Mutante *13.5* mit ca. 270% NR-Aktivität diesbezüglich deutlich stärker reagiert. Ähnlich wie die *aba3*-Mutanten aus *Arabidopsis* verhält sich auch die *aba1*-Mutante aus *Nicotiana plumbaginifolia*, für die ebenfalls ein Defekt der Moco-Sulfurase postuliert wird (Leydecker *et al.*, 1995). Hier liegt die Erhöhung der NR-Aktivität gegenüber dem Wildtyp bei ca. 160% und damit in ähnlichen Bereichen, wie für die Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* bestimmt. Zusätzlich konnte für die *aba1*-Mutante auch eine um ca. 1,5 x verstärkte NR-Apoproteinexpression gezeigt werden, wofür Leydecker *et al.* (1995) im wesentlichen eine Kompetition unter den Mo-Enzymen um den limitierenden Moco als Ursache in Betracht zogen. Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit ermittelten AO-, XDH- und NR-Aktivitäten der *aba3*-Mutanten und der Ergebnisse von Akaba *et al.* (1998) und Schwartz *et al.* (1997) ergibt sich jedoch ein anderes Bild: Da die Aktivitäten von AO und XDH in den (putativen) Moco-Sulfurase-Mutanten durch Behandlung mit Sulfid und Dithionit bis auf Wildtyp-Niveau restauriert werden können, muß angenommen werden, daß alle Mutanten normale Mengen an AO und XDH besitzen, die zudem den Moco bereits inseriert haben. Für die *aba3.1*-Mutante aus *Arabidopsis* konnte dies bereits durch Schwartz *et al.* (1997) bestätigt werden. Somit ergeben sich eher folgende Möglichkeiten, die die Erhöhung der NR-Aktivität und der NR-Apoproteinmenge in den *aba3*-Mutanten bzw. der *aba1*-Mutante zur Folge haben könnten: (i) Da die Moco-Gehalte von AO und XDH in den Moco-Sulfurase-Mutanten konstant bleiben, die NR aber einen erhöhten Bedarf hat, müßte die Gesamt-Moco-Menge gesteigert werden. Hierzu wäre eine Induktion der Moco-Synthese notwendig, die bisher jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Allerdings ist die Induzierbarkeit der NR-Expression unter Streßbedingungen wie Wasser-Mangel bereits seit langem bekannt (Huffaker *et al.*, 1970; Heuer *et al.*, 1979), und wie man heute weiß, werden unter diesen Bedingungen auch die

entsprechenden AOs in den Blättern von *Arabidopsis* verstärkt exprimiert (Seo *et al.*, 2000a+b), während die Aktivität der XDH unverändert bleibt (diese Arbeit; SO nicht untersucht). Damit einhergehend steigt der Moco-Bedarf von NR und AO, so daß auch eine Verstärkung der Moco-Synthese nicht unwahrscheinlich erscheint. Darüber hinaus kann davon ausgegangen werden, daß die Situation in den *aba3*- bzw. *aba1*-Mutanten eine Dauerstreß-Situation darstellt, so daß es hierdurch zur NR-Überexpression kommt. (ii) Setzt man voraus, daß in der Zelle stets mehr Moco vorhanden ist als alle Mo-Enzyme zu inkorporieren vermögen, so wäre eine Erhöhung der Moco-Synthese bei entsprechendem Bedarf nicht notwendig. Die Sauerstoff-Labilität des Mocos würde jedoch den Schutz des nicht an Mo-Enzyme gebundenen Mocos vor den oxidierenden Bedingungen des Cytosols erfordern, so daß die Gegenwart eines schützenden Proteins notwendig wäre. Ein Protein mit einer solchen Funktion, bezeichnet als Moco-Carrier-Protein (Moco-CP), wurde aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* isoliert (Witte *et al.*, 1998). (iii) Auch eine Kombination beider Hypothesen wäre denkbar und würde den Pflanzen somit enorme Flexibilität im Hinblick auf die Adaptation an verschiedene Stresse ermöglichen. Um das Phänomen der erhöhten NR-Aktivität in den Moco-Sulfurase-Mutanten aufzuklären, wäre unbedingt eine Untersuchung zur Induzierbarkeit der an der Moco-Synthese beteiligten *cnx*-Gene sowie zur Verteilung des Mocos auf seine Nutzer notwendig.

Auch im Hinblick auf den visuell zu erfassenden Phänotyp unterscheiden sich die *aba3*-Mutanten nicht nur von den korrespondierenden Wildtypen sondern z.T. auch sehr deutlich untereinander. So setzt zwar bei allen drei Mutanten vorzeitig die Keimungsphase ein, jedoch keimt die *13.5* stets als erste der Mutanten noch vor der *aba3.2* und diese wiederum noch vor der *aba3.1*. Auch die Blühinduktion setzt zuerst in der *13.5*-Mutante, einige Tage später in der *aba3.2* und ca. 1 Woche später in der *aba3.1* ein. In entsprechender Reihenfolge verblühen und vergehen die Mutanten schließlich auch. Interessanterweise setzt sich diese Reihenfolge auch unter Trockenstreß-Bedingungen fort: Während ausgewachsene *13.5*-Mutanten unter normalen Laborbedingungen bereits nach 90 min ca. 50% ihres Trockengewichtes verlieren, dauert dies bei der Mutante *aba3.2* schon ca. 5 h, bei der *aba3.1* sogar ca. 7 h. Da für alle Merkmale die Reduktion des ABA-Gehaltes verantwortlich gemacht werden kann, liegt nahe, daß den jeweiligen Mutanten unterschiedliche Restgehalte an ABA verblieben sind. Die Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* wurden diesbezüglich auch bereits untersucht und untermauern diese Vermutung (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996; Tab. 3.1).

**Tab. 3.1: ABA-Gehalte in Blättern ungestreßter und dehydrierter Pflanzen.** Alle Werte sind in [ng/g Frischgewicht] angegeben. Zum Vergleich enthält die Tabelle entsprechende Werte der *aba1*-Mutante aus Tabak (*N. plumbaginifolia*; Parry *et al.*, 1991). Der Faktor zwischen ABA-Gehalten turgeszenter und dehydrierter Blätter soll ein Maß für die (noch) mögliche *de novo* ABA-Synthese unter Trockenstreß sein.

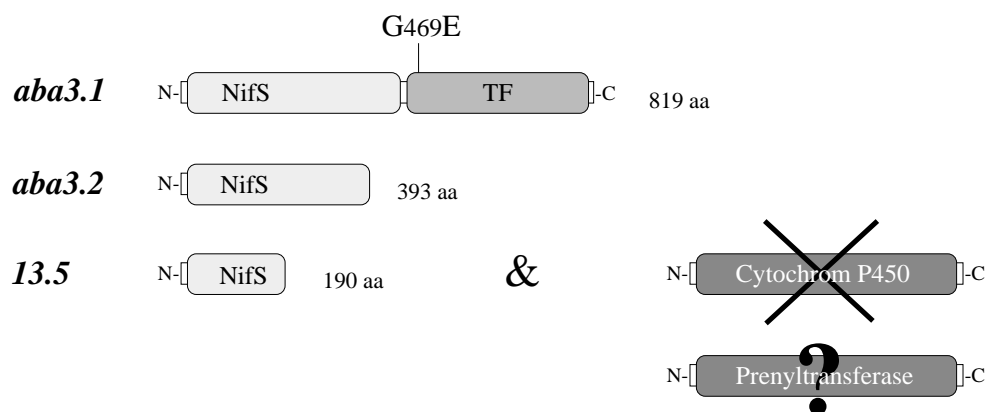
	<i>Arabidopsis thaliana</i>				<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	
Genotyp	Col-O (WT)	<i>aba3.1</i>	Le (WT)	<i>aba3.2</i>	WT	<i>aba1</i>
turgeszent	220	70	180	90	24.8	4.6
gestreßt	2920	290	1610	140	258.2	10.0
Faktor	13.3	4.1	8.9	1.6	10.4	2.2

Die Werte legen nahe, daß die *aba3.2*-Mutante mit einer nur sehr geringen ABA-Neusynthese bei Trocken-Streß schlechter an solche Bedingungen angepaßt ist, als die *aba3.1*-Mutante. Folgerichtig müßte die *13.5*-Mutante mit dem ausgeprägtesten Phänotyp geringere Werte und einen noch geringeren Faktor als die *aba3.2* aufweisen, was jedoch noch zu untersuchen wäre. Außerdem bleibt zunächst fraglich, ob neben der unterschiedlich intensiven Streßreaktion auch das zeitlich verzögerte Keim- und Blühverhalten unter den Mutanten auf diese Weise erklärbar ist, da der absolute basale ABA-Gehalt der *aba3.2* über dem der *aba3.1* liegt.

Es drängt sich schließlich die Frage auf, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Phänotyp bzw. der Fähigkeit zur Streß-Adaptation und der Art der Mutation in den Mutanten gibt. Vergleicht man dazu Art, Anzahl und "Schwere" der Mutationen der einzelnen *aba3*-Mutanten, so scheinen tatsächlich Abhängigkeiten der Intensität des *aba3*-Phänotyps von der jeweiligen Mutations-Art aufzutreten. So präsentiert die *aba3.1*-Mutante mit einem einfachen Aminosäure-Austausch an konservierter Position von allen drei Mutanten den "leichtesten" Phänotyp. Die *aba3.2*-Mutante weist mit ihrer Spleiß-Mutation, die zur Verkürzung eines evtl. translatierten ABA3-Proteins von 819 auf 393 aa führen würde, bereits einen deutlich stärkeren, vermutlich sogar einen vollständigen ABA3-defizienten Phänotyp auf. Dieser wird jedoch von der *13.5*-Mutante nochmals "überboten", indem es neben der Spleiß-Mutation im *aba3*-Transkript, verbunden mit der Verkürzung eines evtl. translatierten Proteins auf 190 aa, zu einer weiteren Mutation an mindestens einem anderen ABA-relevanten Gen-Locus kommt. Wie die Abbildung 3.3 zusammenfassend darstellt, spielt möglicherweise auch die Einteilung des ABA3-Proteins in zwei distinkte Domänen im Fall der *aba3.1*-Mutante eine Rolle. Die N-terminale NifS-ähnliche Domäne wird für die Rekrutierung und Übertragung des cyanolysierbaren Schwefels verantwortlich gemacht, während der C-terminalen Domäne eher eine Funktion bei der

Erkennung von AO und XDH bzw. der Regulation anderer Gene zugeordnet wird (Amrani *et al.*, 2000; Bittner *et al.*, 2001). Da sich die Mutation der *aba3.1* innerhalb eines konservierten Motivs der C-terminalen Domäne befindet, kommt es möglicherweise "nur" zum Verlust derjenigen Funktionen von ABA3, die durch dieses Motiv bestimmt werden. Allerdings muß dieses Motiv immer noch so bedeutungsvoll sein, daß die Mutante die Sulfurierungsfunktion vollständig verliert, obwohl Mutation und betroffene Funktion in unterschiedlichen Domänen lokalisiert sind. Der Verlust zur Fähigkeit der Erkennung von AO und XDH wäre hier demnach eine mögliche Erklärung.

Zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation wie in den Mutanten *aba3.2* und *13.5* müßte es auch in der erst vor kurzem beschriebenen und zu *aba3* allelen Mutante *los5-1* kommen (Xiong *et al.*, 2001). Durch einen G → A-Austausch an der cDNA-Position 360 käme es hier im Falle einer Translation zu einem auf 119 aa verkürzten Protein. Entsprechend ähnlich sind sich die "starken" Phänotypen von *aba3.2* und *los5-1* im Hinblick auf Blüh- und Streß-Adaptations-Verhalten. Demnach kommt der "starke" Phänotyp der Mutanten *aba3.2*, *13.5* und *los5-1* durch den simultanen Verlust aller (putativen) ABA3-Funktionen zustande, bewirkt durch den frühzeitigen Abbruch der Translation von ABA3.



**Abb. 3.3: Schematische Darstellung der beschriebenen Mutationen in den Mutanten *aba3.1*, *aba3.2* und *13.5*.** Während das ABA3-Protein der *aba3.1*-Mutante vollständig translatiert wird, entstehen im Falle einer Translation die Proteine der Mutanten *aba3.2* und *13.5* nur in verkürzten Versionen.

### 3.2.2.1. Welche Rolle spielt die T-DNA Integration in der Mutante 13.5?

Wie unter 3.2.2. beschrieben, unterscheidet sich die Mutante 13.5 von den Mutanten *aba3.1* und *aba3.2* durch ihren stärker ausgeprägten ABA-defizienten Phänotyp. Von allen drei Mutanten keimt, blüht und welkt die 13.5 als erste. Da die Art der Mutation der 13.5 der der *aba3.2* aber sehr ähnlich ist, kann diese allein hierfür nicht verantwortlich gemacht werden. Vielmehr scheint die zweite Mutation der 13.5, die T-DNA Integration im Cytochrom P450 homologen Gen, die Ausprägung des Phänotyps mitzubestimmen. Hierbei spielt die genomische Lokalisierung des Cytochrom P450 homologen Gens mit dem T-DNA Tag womöglich eine besondere Rolle. Bei einer Segregationsanalyse der 13.5 wurde die Cosegregation des T-DNA-Tags mit dem *aba3*-Phänotyp festgestellt. Darauf basierend mußte angenommen werden, daß die T-DNA Integration in direktem Zusammenhang mit dem Phänotyp zu sehen ist. Wie sich jedoch in dieser Arbeit herausstellte, befinden sich sowohl das *aba3*-Gen als auch das Cytochrom P450 homologe Gen mit einem Abstand von nur ca. 163 kb auf Chromosom 1 (Gesamtgröße ca. 30.000 kb). Insofern ist die Cosegregation des T-DNA-Tags mit dem Phänotyp tatsächlich auf die Cosegregation der Loci von *aba3* und des Cytochrom P450 homologen Gens zurückzuführen.

Wie aber könnte die T-DNA Integration den Phänotyp der Mutante mitbestimmen? Zur Beantwortung dieser Frage müssen der T-DNA Integrationsort und die flankierenden Gene differenzierter betrachtet werden. Zum einen wurde festgestellt, daß die T-DNA in das zweite Intron eines Cytochrom P450 homologen Gens integriert ist. Zum anderen ist vermutlich eine Cytochrom P450 Monooxygenase an der Konversion geringer Mengen Abscisin-Alkohols zu ABA in AO-defizienten Mutanten beteiligt (Zeevaart, 1999). Diese Mutanten akkumulieren Abscisin-Alkohol, ein Derivat des Abscisin-Aldehyds, da sie letzteres aufgrund ihrer AO-Defizienz nicht zu ABA oxidieren können. Zu diesen Mutanten zählen neben AO-Strukturgen- und Moco-Biosynthese-Mutanten auch die Moco-Sulfurase-Mutanten wie *aba3*. Es ist anzunehmen, daß dieser Nebenweg in solchen Mutanten eine wichtige ABA-Quelle darstellt, um das Überleben der Pflanzen zu sichern. Ein Ausfall dieser bestimmten Cytochrom P450 Monooxygenase würde demzufolge den ABA-Gehalt der Mutanten nochmals reduzieren und den Phänotyp verstärken, wie möglicherweise in der 13.5-Mutante geschehen. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß Cytochrom P450 Monooxygenasen in *Arabidopsis* zu einer Multi-Genfamilie mit ca. 400 Vertretern gehören. Es bleibt daher zunächst offen, ob mit der T-DNA Integration wirklich ausgerechnet die Cytochrom P450 Monooxygenase mit der genannten Funktion geschädigt wurde.

Desweiteren muß ein benachbartes Gen in die Betrachtung einbezogen werden. Im 5'-Bereich des besagten Cytochrom P450 Gens und damit in unmittelbarer Nachbarschaft zum T-DNA-Tag befindet sich ein als Prenyltransferase beschriebenes Gen. Prenyltransferasen führen posttranslationale Modifikationen an anderen Proteinen durch, indem sie diese mit Isoprenoiden über Thioester-Bindungen verknüpfen. Das modifizierte Protein erlangt dadurch Hydrophobizität und kann nun an Membranen verankert werden, wo es seine eigentliche Funktion ausübt. Prenylierung tritt vor allem in Chloroplasten auf und ist möglicherweise auch für die Funktion der an der Karotinoid-Synthese beteiligten Enzyme Geranylgeranyl-Pyrophosphat-Synthase, Phytoen-Synthase, Phytoen-Desaturase und/oder Zeaxanthinepoxydase essentiell. Sollte die T-DNA Integration im Cytochrom P450 homologen Gen die benachbarte Prenyltransferase negativ beeinflussen, könnte allein hierdurch die ABA-Synthese aufgrund eines Mangels an ABA-Vorstufen in der *13.5*-Mutante reduziert worden sein. Beide aufgeführten Möglichkeiten für die *13.5*-Mutante weisen also letztlich auf das Vorliegen einer ABA-Doppel-Mutante hin. Um in dieser Frage Klärung zu erlangen, müßten jedoch eingehende Untersuchungen an beiden Genen bzw. Proteinen, dem Cytochrom P450 Homologen (GenBank AAD50024) und der Prenyltransferase (GenBank AAD50025), durchgeführt werden.

### 3.3. Die Funktionen des ABA3-Proteins

Die in dieser Arbeit klonierte cDNA der putativen Moco-Sulfurase *aba3* kodiert für ein Protein von 819 aa, für das aufgrund von Homologien zu bakteriellen NifS-Proteinen und besonderer Signaturen zwei funktionelle Domänen vorgeschlagen werden. Am N-Terminus findet sich dabei die NifS-homologe Domäne über die ersten 436 aa bis zu einem Lysin an Position 437, das als putative Spaltstelle für eine Signal-Peptidase I vorausgesagt wird. Die die Homologie zu NifS-ähnlichen Proteinen ausmachenden Signaturen sind ein Pyridoxalphosphat (PLP)- und ein Persulfid-Bindungsmotiv an den Positionen K271 und C430 innerhalb konservierter Regionen des ABA3-Proteins. Beide Motive sind außer zu NifS-Proteinen auch unter allen beschriebenen Moco-Sulfurasen konserviert und deuten eine der möglichen Funktionen von ABA3 und anderer Moco-Sulfurasen bereits an: NifS- und NifS-ähnliche Proteine binden über das konservierte Lysin PLP als essentiellen Cofaktor, der wiederum die Bindung eines Persulfides an ein konserviertes Cystein vermittelt (Zheng *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1994; Kaiser *et al.*, 2000). Das



Persulfid entstammt dabei aus dem Umsatz von freiem L-Cystein zu L-Alanin, der die Cystein-Desulfurase-Aktivität des Proteins ausmacht. Der in Form des Persulfides gebundene aktive Schwefel wird schließlich im Fall von NifS-Proteinen auf das Eisen/Schwefel-Cluster-Protein Nitrogenase übertragen (Zheng & Dean, 1994). Aufgrund der N-terminalen Homologien zu NifS-Proteinen liegt auch für Moco-Sulfurasen ein ähnlicher Mechanismus zur Mobilisierung und Übertragung des terminalen Schwefels auf die Rezipienten AO und XDH nahe (Amrani *et al.*, 2000; Kaiser *et al.*, 2000).

Der ca. 380 aa große C-terminale Bereich des ABA3-Proteins zeichnet sich besonders durch das simultane Auftreten mehrerer auf Expression-Regulation hindeutende Motive aus. Darunter treten unter anderem ein Motiv für den Transport des Proteins in den Zellkern am äußersten C-Terminus, ein Zink-Finger-Motiv für die Vermittlung der Bindung des Proteins an Nukleinsäuren sowie ein "Myc-Type Dimerisierungs"-Motiv zur Vermittlung der Dimerisierung von DNA-bindenden Proteinen hervor. Eigenschaften wie die genannten, treffen üblicherweise bei bestimmten Transkriptionsfaktoren zusammen, so daß die C-terminale Domäne des ABA3-Proteins im Folgenden als Transkriptionsfaktor-Domäne bezeichnet werden soll. Homologien der gesamten C-terminalen Domäne zu anderen funktionell beschriebenen Proteinen finden sich hingegen nicht. Jedoch konnten Homologien zu einigen bakteriellen Proteinen mit unbekannter Funktion ausgemacht werden, die unter 3.3.3. genauer diskutiert werden.

### 3.3.1. Bewertung der Überexpression von ABA3 in *E. coli*

Die rekombinante Überexpression von ABA3 aus *Arabidopsis* in *E. coli* brachte ein Protein mit allen für seine Aktivität erforderlichen posttranslationalen Modifikationen hervor. So wurden sowohl der chromophore Cofaktor als auch ein Persulfid gebunden, wie das Spektrum und die gelbe Färbung des aufgereinigten Proteins bzw. die Inaktivierbarkeit des Proteins durch DTT unter Freisetzung von H<sub>2</sub>S zeigen. In der SDS-PAGE-Analyse wurde eine Molekularmasse für das rekombinante Protein von ca. 90 kDa bestimmt, was gut mit der kalkulierten Masse von 92,6 kDa übereinstimmt. Allerdings trat hier stets ein N-terminales Spalt- oder Abbauprodukt von ca. 60 kDa mit fast gleicher Intensität auf, das weder durch Anionenaustausch-Chromatographie, noch durch Gelfiltration vollständig abgetrennt werden konnte. Sowohl für das "full-length"-Protein als auch für das N-terminale Spaltprodukt wurde durch Gelfiltration das Vorliegen als Homodimer gezeigt, woraus geschlossen werden kann, daß die N-terminale NifS-Domäne des

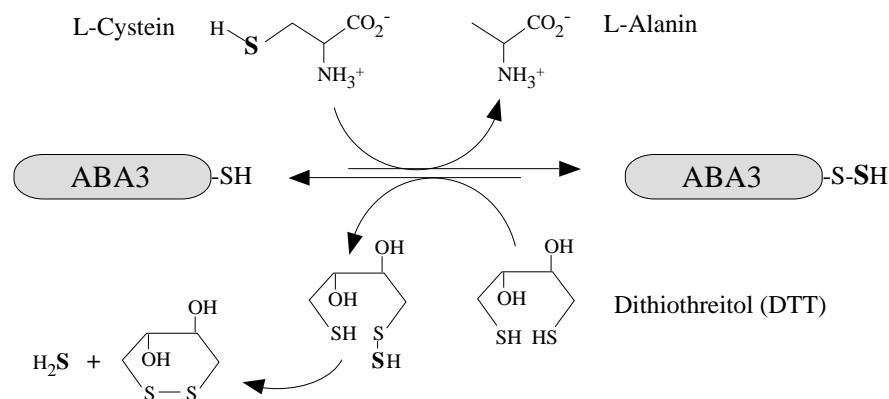
ABA3-Proteins an der Dimerisierung beteiligt ist. Die Dauer der Stabilität des rekombinanten Proteins in Lösung konnte durch Zugabe von Dithiothreitol und PLP auf bis zu 4 Wochen ausgedehnt werden. Möglicherweise ist die Stabilität des ABA3-Proteins auch *in vivo* der Grund dafür, daß eine starke Expression von *aba3* nicht notwendig ist.

### 3.3.2. ABA3 rekrutiert den zu übertragenden Schwefel über seine Cystein-Desulfurase-Aktivität

NifS- und NifS-ähnliche Proteine übertragen einen aus der Desulfurierung von L-Cystein freigesetzten und als Persulfid gebundenen Schwefel auf ihre jeweiligen Rezipienten (Zheng *et al.*, 1993; Zheng & Dean, 1994). Basierend auf den Homologien von NifS-Proteinen zur N-terminalen Domäne von Moco-Sulfurasen, wurde auch für ABA3 eine Mobilisierung des auf den Moco von AO und XDH zu übertragenden Schwefels aus dieser Aminosäure angenommen. In einer ersten funktionellen Beschreibung des rekombinanten ABA3-Proteins wurde daher die Verwertbarkeit der Aminosäure L-Cystein als mögliche Schwefelquelle untersucht.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist rekombinantes ABA3 allein nicht in der Lage, L-Cystein zu desulfurieren. Erst in Gegenwart des Sulfhydrylreagenzes Dithiothreitol (DTT) wird L-Cystein effektiv zu L-Alanin umgesetzt, was sich unter anderem in der Bildung von H<sub>2</sub>S bemerkbar macht. Als Ursache dafür wird zum einen die Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus *E. coli* in bereits Persulfid-beladener Form angesehen, zum anderen die Aufrechterhaltung eines Turnovers durch DTT. Für einen dauerhaften Umsatz von L-Cystein durch ABA3 scheint DTT notwendig zu sein, um das rekombinante, mit Persulfid beladene Protein durch reduktive Spaltung erst von dem Persulfid zu befreien, bevor eine weitere Katalyse stattfinden kann (Abb. 3.4). DTT fungiert dementsprechend an dieser Stelle als Schwefel-Rezipient für das rekombinante ABA3-Protein, d. h. es ersetzt gleichsam die *in vivo*-Rezipienten AO und XDH. Unter einem physiologischen Aspekt kann es als sehr sinnvoll angesehen werden, daß ABA3 seinen als Persulfid gebundenen Schwefel nicht willkürlich abgibt, sondern erst in Gegenwart von entsprechenden Rezipienten, wie den Desulfo-Formen von AO und XDH: L-Cystein würde auf diese Weise der Zelle nicht permanent entzogen werden. Ob allerdings L-Cystein als einziges Substrat in Frage kommt und auch der *in vivo*-Schwefel-Donor ist, bleibt noch zu untersuchen. Einziger bisheriger Hinweis darauf ist die Beobachtung, daß in *Typha* (Rohrkolben) nach Salzstreß mit einer AO-Aktivitätssteigerung auch die verstärkte Expression

der O-Acetylserinthiolase einhergeht (H. Lips, pers. Mitteilung). Letztere katalysiert zusammen mit der Serin-Acetyltransferase die Synthese von L-Cystein.



**Abb. 3.4: Mechanismus des Umsatzes von L-Cystein durch ABA3 in Gegenwart von DTT.** Der Umsatz von L-Cystein findet nur durch Persulfid-freies ABA3 statt. DTT löst dazu die Thioester-Bindung zwischen Persulfid und ABA3 reduktiv und bindet das Persulfid seinerseits an sich, wodurch anschließend  $\text{H}_2\text{S}$  freigesetzt wird. ABA3 steht damit für eine neue Katalyse zur Verfügung.

Neben der Tatsache, daß L-Cystein von ABA3 als Schwefel-Donor genutzt wird, konnte auch der Nachweis der an der Bindung des Persulfids beteiligten Aminosäure geführt werden. Zunächst wurde durch Inhibierung der Cystein-Desulfurase-Aktivität von ABA3 durch thiolpezifisch alkylierendes N-Ethylmaleimid die Beteiligung eines funktionellen Cystein-Restes an der "active site" von ABA3 festgestellt. Basierend auf den Homologien zu NifS-Proteinen war hierfür bereits das Cystein430 des ABA3-Proteins vorgeschlagen. Nach Substitution dieses Cysteins im rekombinanten Protein gegen ein Alanin (C430A) verlor ABA3 seine Cystein-Desulfurase-Aktivität fast vollständig, wodurch eine Beteiligung des Cysteins430 an der "active site" untermauert werden konnte. Die verbleibende Restaktivität ist vermutlich auf eines der beiden Cysteine in der unmittelbaren Nachbarschaft des Cysteins430 zurückzuführen. Andere Eigenschaften des Proteins wie die Expressionsstärke und die Bindung des Chromophors blieben hingegen von der Mutation unbeeinflusst. Als Konsequenz aus der stark reduzierten Cystein-Desulfurase-Aktivität wurde auch der Verlust der Fähigkeit zur Sulfurierung des Mocos der rekombinanten AO festgestellt. Mit Hilfe eines weiteren gezielten Aminosäure-Austausches wurde die Beteiligung des konservierten Lysins271 an der Bindung des chromophoren Cofaktors, vermutlich PLP, zu beweisen versucht. Die Substitution des Lysins gegen ein Serin (K271S) bewirkte, daß das aufgereinigte und aufkonzentrierte Protein die für

ABA3 aufgrund des Chromophors typische Gelbfärbung verlor. Entsprechend wurde der Verlust der Cystein-Desulfurase-Aktivität sowie der Verlust der Fähigkeit zur AO -Rekonstitution festgestellt. Obwohl die Expressionsstärke bei beiden mutagenisierten ABA3-Proteinen unverändert blieb, kann dennoch ein struktureller Einfluß auf die untersuchten Eigenschaften nicht vollständig ausgeschlossen werden. Hierzu brächten die Strukturauflösung von Wildtyp-ABA3 und mutagenisierten Proteinen den endgültigen Beweis für die spezifischen Funktionen der interessierenden Aminosäuren.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob die Cystein-Desulfurase-Aktivität auf einen bestimmten Bereich des ABA3-Proteins zu begrenzen ist, wie dies die Homologien zu NifS-Proteinen andeuten. Da bei der Aufreinigung des rekombinanten Proteins stets das vollständige Protein und ein N-terminales Spaltprodukt von ungefährrer Größe der postulierten NifS-Domäne erhalten wurden, waren erste Hinweise auf das Vorliegen von ABA3 in separaten Domänen gegeben. Eine putative Spaltstelle (K437) für eine Signal-Peptidase I zwischen der NifS- und der Transkriptionsfaktor-Domäne sowie eine mögliche, am C-Terminus von ABA3 selbst lokalisierte autokatalytische Spaltfunktion untermauerten diese Hinweise. Durch Überexpression der 437 aa großen NifS-Domäne von ABA3 wurde jedoch gezeigt, daß diese allein weder zur Desulfurierung von L-Cystein, noch zur Sulfurierung der Desulfo-AO imstande ist. Darüber hinaus unterscheidet sich deren Monomer-Größe leicht von der des N-terminalen Spaltproduktes, wodurch ersichtlich wird, daß die Spaltung des rekombinanten "full-length"-Proteins wohl eher auf ein unspezifisches Phänomen in *E. coli* zurückgeführt werden muß. Insgesamt kann demnach geschlußfolgert werden, daß sowohl für die Cystein-Desulfurase- als auch für die Moco-Sulfurierungs-Aktivität das als Dimer vorliegende "full-length"-Protein benötigt wird. Eine spezifische Spaltung des Proteins erscheint nunmehr nur noch zur Entwicklung der Transkriptionsfaktor-Aktivität sinnvoll.

### **3.3.3. Die ABA3-vermittelte Moco-Sulfurierung von AO und XDH**

Obwohl eine Vielzahl von Moco-Sulfurase-Mutanten bekannt und einige der putativen Moco-Sulfurasen kloniert sind (*maroon-like*, *Drosophila*; *hxB*, *Aspergillus*; *aba3*, *Arabidopsis*; *mcsu*, *Rind*; *hmcs*, *Mensch*), ist bisher keines der entsprechenden Proteine biochemisch oder funktionell charakterisiert worden. Stellvertretend für alle eukaryontischen Moco-Sulfurasen wurde daher in dieser Arbeit ein Assay mit rekombinantem ABA3 für die Sulfurierung von

Monooxo-Mo-Hydroxylasen wie AO und XDH unter definierten Bedingungen entwickelt. Um im homologen System zu bleiben, wurde eine von vier für *Arabidopsis* beschriebenen AOs (Sekimoto *et al.*, 1998) als Repräsentant für alle Monooxo-Mo-Hydroxylasen ausgewählt. Die AO, kodiert durch das *ao1*-Gen und zum Homodimer assembliert durch die zwei AAO1-Monomere, war hierzu aufgrund ihres Substratspektrums, ihrer gut charakterisierten biochemischen Eigenschaften (Akaba *et al.*, 1999) sowie durch die Exprimierbarkeit in der Hefe *Pichia pastoris* (Koiwai *et al.*, 2000) gut geeignet.

Zunächst konnte gezeigt werden, daß die AO bereits in aktiver, d. h. sulfurierter Form aus *Pichia* aufgereinigt wird (Koiwai *et al.*, 2000; diese Arbeit). Demnach muß *Pichia* alle notwendigen postrationalen Modifikationen durchführen können, unter anderem auch die Sulfurierung des Moco. Diese ist aber nur unvollständig, wie die Sulfurierungsversuche mit rekombinantem ABA3 gezeigt haben. Die Aktivität der unbehandelten AO konnte durch die alleinige Gegenwart von ABA3 bereits erhöht und durch den Zusatz von L-Cystein nochmals leicht gesteigert werden. Durch Behandlung mit Kalium-Cyanid partiell inaktivierte AO weist dasselbe Verhalten auf, allerdings ist ABA3 in diesem Fall nicht in der Lage, die maximal erreichbare Sulfurierung zu erzielen. Dieser Zustand kann lediglich durch Behandlung der inaktivierten AO mit Sulfid und Dithionit unter anaeroben Bedingungen erreicht werden. Ein vergleichbares Phänomen wurde in Protein-Rohextrakten von *Nicotiana plumbaginifolia* und *Lycopersicon esculentum* beobachtet. Die basale AO-Aktivität der jeweiligen Wildtypen konnte hier durch die anaerobe Behandlung mit Sulfid und Dithionit deutlich erhöht werden (Akaba *et al.*, 1998; Sagi *et al.*, 1999). Demnach liegen sowohl das native als auch das rekombinante AO-Protein z. T. in sulfurierter, aktiver und z. T. in unsulfurierter, inaktiver Form vor, wie dies bereits für XDH/XO aus Rind beschrieben ist (Wahl & Rajagopalan, 1982; Nishino *et al.*, 1983; Enroth *et al.*, 2000). Man könnte unterstellen, daß diese Moco-Sulfurasen nur einen bestimmten Teil der AO- bzw. XDH-Proteine im sulfurierten, aktiven Zustand halten, um im Bedarfsfall durch Sulfurierung der zwar vorhandenen, aber bisher inaktiven AO- und XDH-Proteine schnell auf neue Anforderungen reagieren zu können.

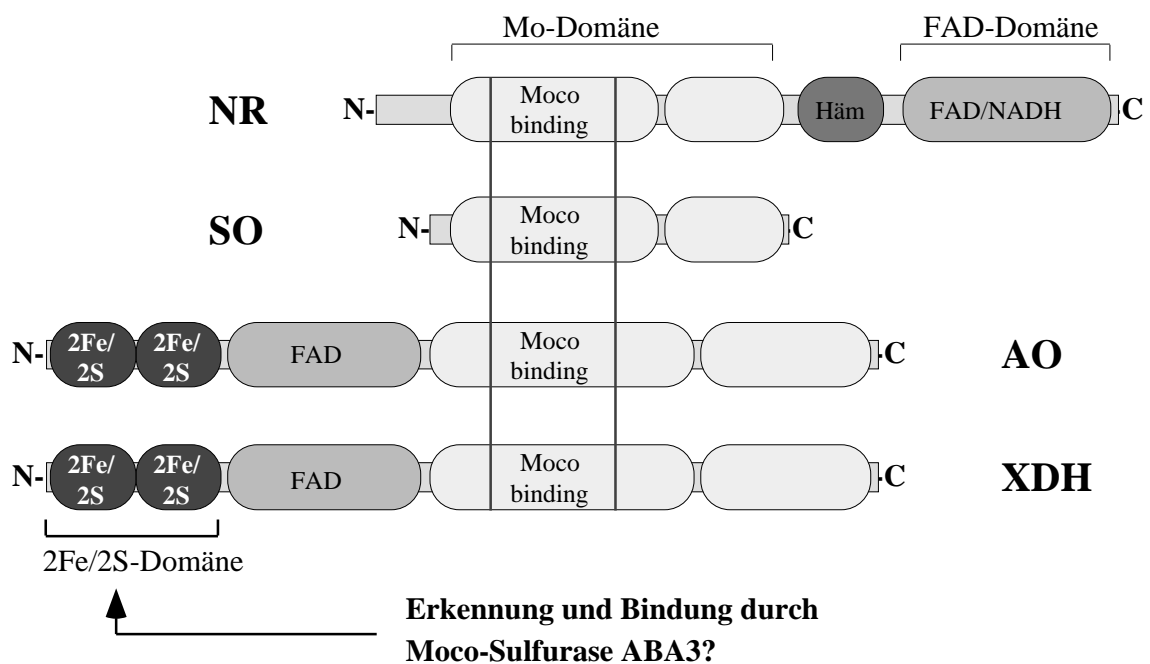
Als gemeinsamer Nachweis beider postulierter Aktivitäten von ABA3, der Cystein-Desulfurase-Aktivität und der Moco-Sulfurierungs-Aktivität, diente ein Versuch mit KCN-inaktivierter AO und DTT-inaktiviertem ABA3 in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von L-Cystein. So konnte ohne L-Cystein keine durch ABA3 vermittelte Sulfurierung der inaktivierten AO festgestellt werden, während in Gegenwart von L-Cystein eine Sulfurierung der AO, gemessen an ihrer

Aktivitätssteigerung, stattfand. Da auch L-Cystein allein nicht zur Sulfurierung der AO in der Lage ist, können insgesamt folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

- (1.) DTT vermag ABA3 zu inaktivieren, indem es das proteingebundene Persulfid durch reduktive Spaltung abtrennt und als H<sub>2</sub>S freisetzt.
- (2.) Durch Umsatz von L-Cystein belädt sich ABA3 erneut mit Persulfid, welches es schließlich auf die Desulfo-AO überträgt.
- (3.) Für die Übertragung des Schwefels auf die AO ist unter *in vitro*-Bedingungen außer ABA3 kein weiteres Protein notwendig, d. h. es muß zumindest zu einem losen Kontakt zwischen AO und ABA3 kommen.
- (4.) Da die in dem Assay verwendete AO lediglich desulfuriert wurde, aber immer noch als Dimer vorliegt und Moco assembliert hat, muß die Sulfurierung durch ABA3 am bereits in die AO inkorporierten Moco vorgenommen worden sein. Eine Sulfurierung des Mocos vor dessen Einbau in das AO-Apoprotein erscheint damit unwahrscheinlich.

Mit Hilfe des *in vitro*-Assays zur Untersuchung der Sulfurierung von Monooxo-Mo-Hydroxylasen konnte demnach erstmalig die funktionelle Relevanz von ABA3, stellvertretend für Moco-Sulfurasen allgemein, bewiesen werden. ABA3 desulfuriert L-Cystein und bindet den daraus freigesetzten Schwefel in Form eines Persulfids höchstwahrscheinlich an das Cystein 430. Von dort wird der Schwefel ohne Beteiligung eines weiteren Proteins auf den bereits inkorporierten Dioxo-Moco der inaktiven Hydroxylasen AO und XDH übertragen, um den jeweiligen Enzymen ihre Aktivität zu verleihen. Dabei könnte die Region um das Cystein430 des ABA3-Proteins eine aus dem Protein herausragende Schleife mit dem gebundenen Persulfid am äußersten Ende ausbilden, wie für das NifS-ähnliche Protein TM1692 aus *Thermotoga maritima* beschrieben (Kaiser *et al.*, 2000). Ein solche Schleife wäre vermutlich in der Lage, den im Inneren der AO- bzw. XDH-Apoproteine verborgenen Moco durch eine über ihm gelegene kanalartige Öffnung (Romao *et al.*, 1995; Enroth *et al.*, 2000) zu erreichen und den Schwefel dorthin zu übertragen. Für eine Sulfurierung des Mocos nach Inkorporation in die AO- bzw. XDH-Apoproteine spricht auch die Beobachtung, daß keine der bekannten (putativen) Moco-Sulfurasen Pterin-Binde-Domänen zu besitzen scheint. Diese sind üblicherweise jedoch all den Proteinen zueigen, die mit dem Moco interagieren oder den Moco inkorporieren (Wooton *et al.*, 1991; Rivers *et al.*, 1993; Kamdar *et al.*, 1994).

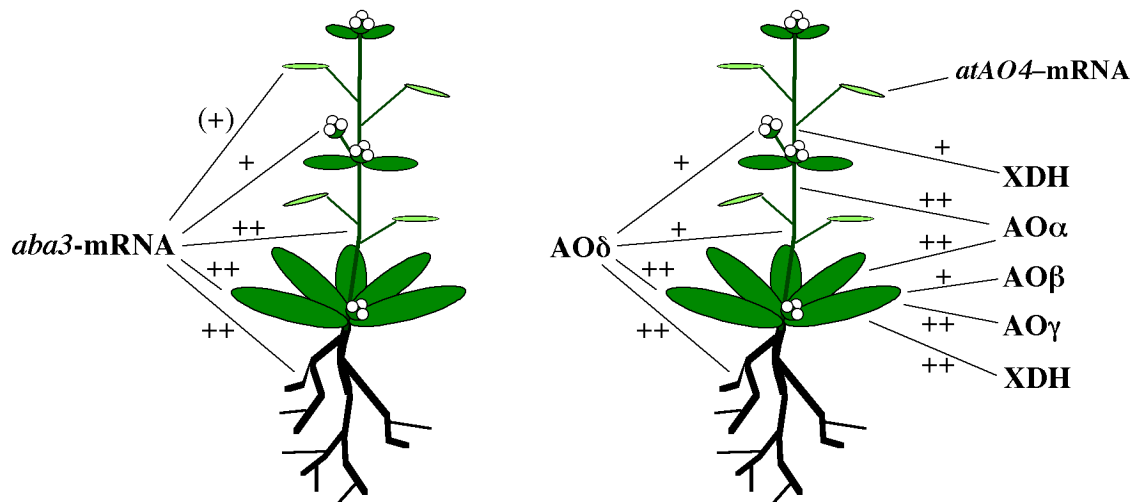
Eine Interaktion zwischen ABA3 und AO/XDH könnte über bestimmte Bereiche des C-Terminus von ABA3 vermittelt werden. Gerade in den letzten ca. 250 aa treten Homologien zu bakteriellen Proteinen unbekannter Funktionen auf (*Vibrio cholerae*, GenBank AAF96821 und *E. coli*, GenBank AAC74033), die 2Fe/2S-Cluster innerhalb Ferredoxin-ähnlicher Domänen zu binden scheinen bzw. für die die Bindung von 2Fe/2S-Clustern bestätigt wurde (*E. coli* AAC74033; S. Leimkühler, pers. Mitteilung). Unter Berücksichtigung der C-terminalen Homologien von ABA3 zu diesen 2Fe/2S-bindenden Proteinen kann angenommen werden, daß die C-terminale Domäne von ABA3 die spezifische Struktur der 2Fe/2S-Zentren seiner Zielproteine AO und XDH erkennt und an sie bindet. Gleichzeitig stellen die 2Fe/2S-Zentren wesentliche Unterschiede zwischen den Molybdo-Enzymen der Xanthinoxidase-Klasse und der Sulfitoxidase-Klasse dar. Während AO und XDH zur Xanthinoxidase-Klasse gehören und 2Fe/2S-Zentren besitzen, fehlen diese den Enzymen NR und SO der Sulfitoxidase-Klasse (Abb. 3.5), deren Aktivität von der Sulfurierung durch eine Moco-Sulfurase unabhängig ist. Die Spezifität von ABA3 gegenüber AO und XDH könnte demnach auf die 2Fe/2S-Cluster von AO und XDH zurückzuführen sein, deren individuelle Faltung vom C-Terminus des ABA3-Proteins erkannt wird (Amrani *et al.*, 2000; Bittner *et al.*, 2001).



**Abb. 3.5: Domänenstruktur der verschiedenen Molybdo-Enzyme in *Arabidopsis thaliana*.** Deutlich zu sehen ist die Präsenz je zweier N-terminaler 2Fe/2S-Zentren in Aldehydoxidasen (AO) und Xanthindehydrogenasen (XDH), die in der Nitratreduktase (NR) und Sulfitoxidase (SO) fehlen.

### 3.4. ABA3 unterliegt der Regulation durch diverse Stresse und wirkt seinerseits regulierend auf andere Proteine

Die Analyse der Transkription von *aba3* unter Standard-Kulturbedingungen zeigte eine ubiquitäre, aber unterschiedlich starke Expression von *aba3* in allen Pflanzenorganen, wie für "Single Copy"-Gene häufig zu beobachten. Dabei findet sich die stärkste Expression in Keimlingen sowie in Wurzeln, Rosetten-Blättern und Stengeln von adulten Pflanzen. Die Expression in Blüten ist nur schwach und in Schötchen fast nicht zu detektieren. In seinem Expressionsverhalten scheint sich *aba3* daher den Bedürfnissen seiner Nutzer, speziell den verschiedenen Isoformen der vier *Arabidopsis*-AOs, anzugleichen (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6: Expression von *aba3* und Aktivität von AOs und XDH in verschiedenen Geweben von adulten *Arabidopsis*-Pflanzen.** Starke Expression bzw. Aktivität ist durch ++ gekennzeichnet, mittelstarke Expression bzw. Aktivität durch + und schwache Expression bzw. Aktivität durch (+). Es wird deutlich, daß die Gewebe mit der stärksten *aba3*-Expression auch die höchsten AO- und XDH-Aktivitäten besitzen.

Diese sind in adulten Pflanzen ebenfalls mehrheitlich in Rosetten-Blättern (*AOδ*, *AOα*, *AOβ*, *AOγ*) im Stängel (*AOδ* und *AOα*) und vor allem die *AOδ* in der Wurzel vorhanden (Seo *et al.*, 2000b). In Blüten finden sich lediglich die *AOδ* sowie Transkripte der wenig beschriebenen *atAO4*, die als einzige auch in Schötchen nachzuweisen ist. In Keimlingen treten hingegen vor allem *AOδ* und *AOα* auf, mit minderer Häufigkeit aber auch *AOβ* und *AOγ*. Da bisher keine pflanzliche XDH kloniert wurde, ist über deren Expression nur sehr wenig bekannt. In dieser



Arbeit begleitend zur *aba3*-Expression durchgeführte Untersuchungen zeigten aber starke XDH-Aktivitäten in Blättern, Stengeln und Keimlingen. Demnach stimmen auch zumindest diese Orte der XDH-Aktivitäten mit der *aba3*-Expression überein. Über eine genauere Untersuchung der Transkription in Blättern und Wurzeln zu verschiedenen Tageszeiten wurde darüber hinaus eine (fast) konstitutive Expression von *aba3* im Verlauf des Tages festgestellt. Lediglich in Blättern trat in allen unabhängigen Experimenten eine Expressions-Steigerung ca. 5 h nach Beginn der Lichtphase ein. Dies kann evtl. als kurzfristige Reaktion auf lichtbedingte Induktion von AO und/oder XDH gewertet werden, wofür weitere Hinweise bisher aber fehlen. Darüber hinaus kann eine mehr oder minder verstärkte Expression von *aba3* unter Einfluß verschiedener Stresse beobachtet werden. So scheint eine Behandlung von *Arabidopsis* mit 200 mM NaCl-Lösung sowie eine Verwundung von Blättern durch Punktierung eine leichte Steigerung der *aba3*-Expression zu bewirken. Eine Salz-abhängige Expressionssteigerung von *aba3* konnten auch Xiong *et al.* (2001) feststellen, die jedoch 300 mM NaCl für einen längeren Zeitraum zusetzten und wohl aufgrund dessen eine deutlichere Steigerung detektieren konnten. Eine sehr starke Erhöhung der Expression von *aba3* wird aber durch Trockenstreß erreicht. Pflanzen, die während eines 4 h andauernden Trockenstresses 40 - 50% ihres Trockengewichtes verlieren, antworten mit ca. 10-fach verstärkter *aba3*-Expression in Blättern auf die neuen Umweltbedingungen. Gleichzeitig kann auch eine Erhöhung der Aktivitäten aller präsenten AOs nachgewiesen werden, während die XDH-Aktivität zu diesem Zeitpunkt unverändert bleibt. Dabei reagiert vor allem die Abscisinaledehyd-bevorzugende AO mit erhöhter Aktivität und, wie Seo *et al.* (2000b) zeigen konnten, als einzige der vier AOs mit stark erhöhter Expression ihrer mRNA *atAO3*. Es ist offensichtlich, daß diese Art von Streß die Pflanze zwingt, mit erhöhter ABA-Synthese dem Wasserverlust entgegen zu wirken. Über den ABA-Gehalt werden die Stomata und damit der Wasserhaushalt reguliert sowie die Expression vieler Austrocknungstoleranz-vermittelnder Proteine induziert. Als Anpassung an einen solchen Trockenstreß kann ABA3 hier zunächst durch Sulfurierung der vorhandenen inaktiven Desulfo-AOs die Aktivitäten dieser AOs steigern. Bei anhaltendem Streß wird die *atAO3* induziert, deren von ihr kodierte Monomere die homodimere AO bilden. Diese wiederum besitzt von allen AOs die höchste Spezifität für Abscisinaledehyd, der unmittelbaren Vorstufe des für die Streßantwort erforderlichen Phytohormons ABA, und ist somit wesentlich für die Streß-induzierte ABA-Synthese verantwortlich (Seo *et al.*, 2000b). Erstaunlicherweise wurde festgestellt, daß mit der Erhöhung der AO-Aktivitäten nicht auch die Erhöhung der XDH-Aktivität einhergeht. Da aber auch die XDH permanent zu bestimmten Anteilen in der Desulfo-Form vorhanden ist, nicht aber

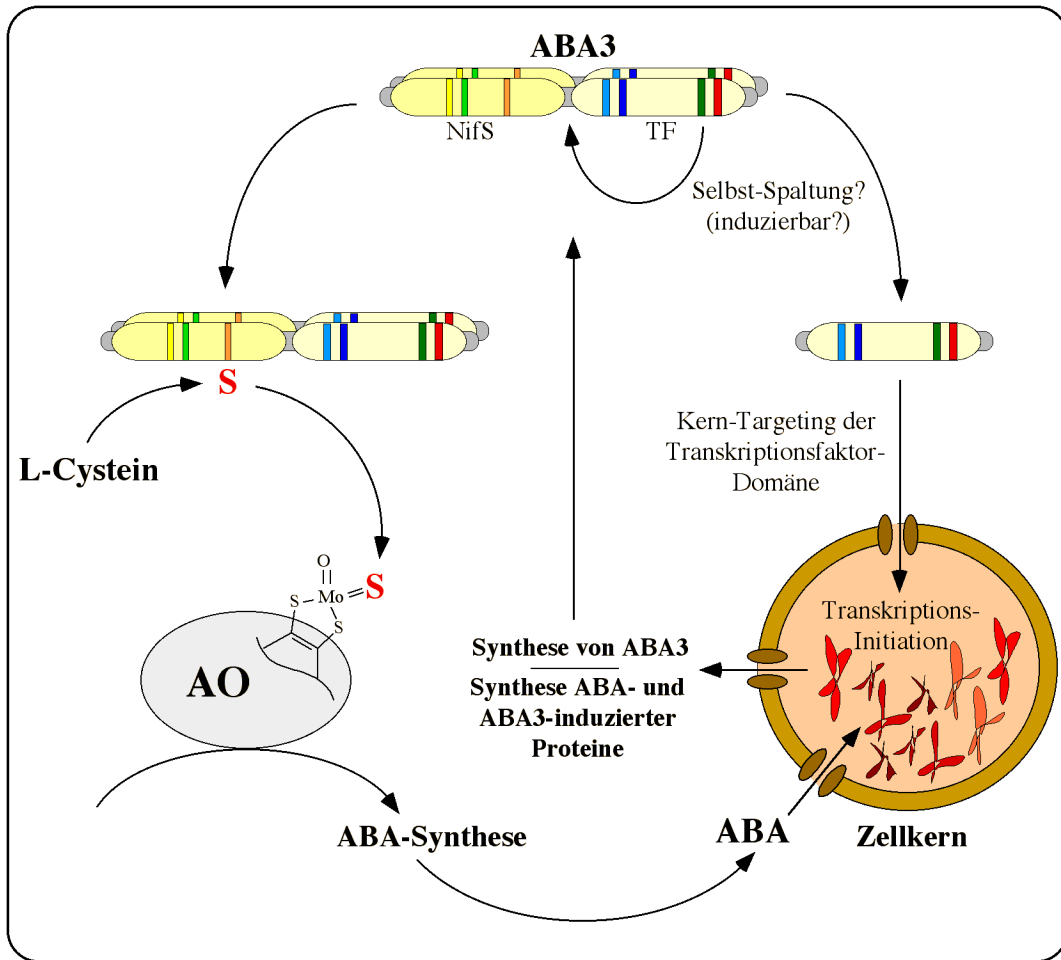
sulfuriert wird, müßte die Sulfurierung der AOs durch ABA3 selektiv erfolgen. Demnach sollte ABA3 nicht nur zur Unterscheidung von Monooxo-Mo-Hydroxylasen (AO und XDH) und Dioxo-Mo-Enzymen (NR und SO) in der Lage sein, sondern auch zwischen AO und XDH trennen können. Beide Enzyme sind jedoch so eng miteinander verwandt, daß sie sich in signifikanter Weise nur in ihren Substrat-Spezifitäten und -Bindungssignaturen unterscheiden (Krenitsky *et al.*, 1974). Inwiefern eine Unterscheidung über diese Eigenschaft möglich ist, muß jedoch voerst ungeklärt bleiben.

Desweiteren kontrolliert ABA3 die Induktion einiger Streßtoleranz-vermittelnder Proteine wie unter anderem von RD29A (salt + cold stress responsive protein), COR15 (cryprotective activity protein), COR47 (dehydrin), RD22 (responsive to dehydration) und P5CS (pyrroline-5-carboxylate-synthase) bei osmotischen Stressen (Xiong *et al.*, 2001). Hiervon werden einige durch ABA, also nur indirekt durch ABA3, induziert, während die Induktion von COR15A und P5CS ABA-unabhängig ist und über andere Wege durch ABA3 reguliert werden muß. Möglicherweise kommt hier die Transkriptionsfaktor-Funktion von ABA3 zum Tragen, denn wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ein Fusionskonstrukt aus dem GFP-Protein und dem Kernlokalisierungs-Signal von ABA3 wird vermehrt aus dem Cytosol in den Kern transportiert. Die Moco-Sulfurase-Funktion von ABA3 ist aber im Cytosol erforderlich, so daß vermutlich bestimmte Bedingungen vorherrschen müssen, um ABA3 in den Kern zu bringen bzw. das Protein dazu evtl. vorher in seine Domänen zu spalten. Ob ABA3 im Kern wirklich die Rolle eines Transkriptionsfaktors übernimmt und welche Gene ABA3 dort reguliert, muß ebenfalls noch untersucht werden.

Unter Berücksichtigung der bisherigen Daten und der Beobachtung, daß ABA3 nicht nur Austrocknungstoleranz, sondern auch Salz- und Kältetoleranz vermittelt (Xiong *et al.*, 2001), kann zusammenfassend festgestellt werden, daß ABA3 ein Schlüssel-Regulator der ABA-Biosynthese, der Streß-Toleranz sowie der Streß-abhängigen Gen-Induktion ist. Indem ABA3 den Sulfurierungsstatus von AO und XDH kontrolliert, wirkt es limitierend auf alle AO- und XDH-abhängigen Prozesse, wie die Synthese der Phytohormone ABA und Indolessigsäure. Die Tatsache, daß die Expression von *aba3* selbst durch ABA induzierbar ist (Xiong *et al.*, 2001), deutet darüber hinaus auf eine positive "Feedback"-Regulation der ABA-Synthese durch ABA hin.

### 3.4.1. Die physiologische Bedeutung der Moco-Sulfurase für die Pflanze

Die erste offensichtliche Funktion der pflanzlichen Moco-Sulfurase ist, wie in dieser Arbeit gezeigt, die Sulfurierung von AO und XDH zu deren Aktivierung. Dies geschieht jedoch nicht willkürlich, sondern in einer durch die Moco-Sulfurase regulierten Weise: Unter Normal-Bedingungen werden AO und XDH nur zu bestimmten Anteilen in aktiver Form in der Zelle gehalten, um im kurzfristigen Bedarfsfall, z.B. bei Trockenstreß wie Licht-Schatten-Wechsel, schnell mit der Sulfurierung der bisher inaktiven Desulfo-AOs reagieren zu können. Auf diese Weise können schnell größere Mengen des Phytohormons ABA gebildet werden, das wiederum die Anpassung an diverse Stresse vermittelt, indem es unter anderem die Expression verschiedener Streß-Toleranz-vermittelnder Gene reguliert. Bei länger anhaltendem Streß werden sowohl ABA3 als auch die entsprechenden Zielproteine (AO, evtl. auch. XDH) selbst verstärkt exprimiert, um in größerem Umfang angemessen auf die neue Situation reagieren zu können. Vermutlich bewirkt dabei die kurzfristige Reaktion eine vermehrte ABA-Synthese, die, wenn die zusätzliche ABA-Menge nicht zuvor wieder abgebaut wird, wiederum die Expression von ABA3 über dessen ABA-Response-Element induziert. Zusammen mit der ebenfalls verstärkt exprimierten AO kann ABA3 nun eine langfristig verstärkte ABA-Synthese antreiben und dadurch eine Kaskade von ABA-abhängigen, Streß-Toleranz-vermittelnden Genen induzieren. Jedoch werden nicht alle während eines Stresses exprimierten Gene durch ABA induziert, sondern auch über andere Wege, wie die Analyse der *los5*-Mutante gezeigt hat (Xiong *et al.*, 2001). Unter Berücksichtigung seiner besonderen Signaturen bzw. seiner C-terminalen Transkriptionsfaktor-Domäne käme möglicherweise auch ABA3 selbst als ein Induktor für die Expression von Genen in Betracht. Um eine solche Funktion ausüben zu können, müßte ABA3 von der Form, in der es die Cystein-Desulfurase- und Moco-Sulfurase-Aktivität im Cytosol ausübt, in eine andere Form wechseln, durch die die Transkriptionsfaktor-Funktion im Kern ermöglicht wird. Da ABA3 mit seiner Dimergröße von ca. 180 kDa größer als andere Transkriptionsfaktoren wäre, aber eine interne putative Spaltungsstelle für eine Signal-Peptidase sowie eine eigene putative Signal-Peptidase-Funktion besitzt, könnte die Separierung der C-terminalen Domäne ABA3 eine für diese Funktion günstige Form geben. Die Abbildung 3.7 verdeutlicht diese Hypothese zusammenfassend, muß allerdings offen lassen, welche Gene durch ABA3 induziert werden und wodurch die Spaltung von ABA3 in seine Domänen initiiert wird.



**Abb. 3.7: Modell der Beteiligung von ABA3 an der Sulfurierung von AO/XDH und der Regulation der ABA-Synthese sowie der ABA- und ABA3-abhängigen Gen-Induktion.** Das als Dimer vorliegende ABA3 muß zunächst durch Desulfurierung von L-Cystein mit einem Persulfid beladen werden, welches auf AO/XDH zu deren Aktivierung übertragen wird. Sobald eine entsprechende Streß-Situation eintritt, werden vorrangig die Desulfo-AOs sulfuriert, um schnell ABA bilden zu können. Bei anhaltendem Streß werden ABA3 durch ABA und die AO verstärkt exprimiert, um eine dauerhafte ABA-Synthese als primäre Streß-Antwort aufrecht zu erhalten. Möglicherweise findet zu diesem Zeitpunkt die Spaltung von ABA3 statt und es kommt zur ABA- und ABA3-abhängigen Gen-Induktion (NifS = NifS-Domäne von ABA3; TF = Transkriptionsfaktor-Domäne von ABA3).

Wie die Phänotypen der pflanzlichen Moco-Sulfurase-Mutanten *aba3* aus *A. thaliana*, *aba1* aus *N. plumbaginifolia* und *flacca* aus *L. esculentum* zeigen, ist die Moco-Sulfurase primär für die Aufrechterhaltung des Phytohormonhaushaltes, verbunden mit der Stomata- bzw. Osmoregulation, sowie für den Purin-Metabolismus notwendig. Darüber hinaus vermittelt sie aber auch die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen in so bedeutungsvoller Weise, daß die entsprechenden Mutanten nach kurzer Zeit eingehen, wenn die Anpassungsreaktion

ausbleibt. Insofern kann die Aktivität der Moco-Sulfurase für Freiland-Pflanzen als essentiell angesehen werden, da diese Pflanzen ständig wechselnden Bedingungen ausgesetzt sind und einer angemessenen Regulation bedürfen. Alle durch die pflanzlichen Moco-Sulfurasen beeinflussten Anpassungsmechanismen können dabei letztlich auf die Aktivierung von AOs zurückgeführt werden, da die XDH in den Moco-Sulfurase-Mutanten physiologisch nicht in signifikanter Weise aufgefallen ist. Dies ist jedoch bei Tieren und Pilzen anders: Hier bestimmt vorrangig die XDH die Ausprägung eines Moco-Sulfurase-defizienten Phänotyps, während die AO in diesen Organismen für den primären Stoffwechsel relativ unbedeutend ist. Entsprechende Mutanten unter den Säugern fallen durch Xanthinurie auf (Ichida *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2000), Fliegen-Mutanten durch deformierte Malpighi-Gefäße mit Pteridin-Globuli (Schwinck, 1960) und *Aspergillus*-Mutanten durch ihre Unfähigkeit, Hypoxanthin oder Nicotinat als alleinige Stickstoffquelle zu nutzen (Scazzocchio 1973; Scazzocchio *et al.*, 1973; Lewis *et al.*, 1978). Strukturell und funktionell gleiche Enzyme haben demnach in Pflanzen eine andere physiologische Bedeutung erlangt als in Tieren und Pilzen. Damit einhergehend mußten sich auch die jeweiligen Moco-Sulfurasen an die Anforderungen anpassen und haben einige Strukturunterschiede sowie stark unterschiedliche Promotoren entwickelt. Ob in anderen Organismen als den Pflanzen eine ähnlich starke Regulation von AO und XDH durch die Moco-Sulfurase stattfindet, ist allerdings noch zu untersuchen und sollte zum besseren allgemeinen Verständnis sowohl der Moco-Sulfurasen als auch von AO und XDH beitragen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Laborstandards

#### 4.1.1. Verwendete Materialien und Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen Biomol, Duchefa, Fluka, Gibco, Merck, Riedel de Haen, Roth, Serva und Sigma bezogen. Zur Modifizierung von DNA wurden Enzyme der Firmen Amersham/Pharmacia, Boehringer, Hybaid, Promega und Stratagene benutzt.

#### 4.1.2. Verwendete Organismen-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Referenz	Kultivierung	Verwendung
<i>Escherichia coli</i>				
DH5	<i>supE 44 lac U169 ( 80lacZ M15) hsd R17 recA endA 1 gyrA 96 thi-1 relA 1</i>	Hanahan (1983)	LB; 37°C	Klonierung, Expression
HB101 (+pRK2013)	<i>supE144 ara 14 galK2 lacY1 (gptPrA)62 rpsL22 Strp<sup>r</sup> xyl-5 mtl-1 rec13 (mcrC-mrr)HsdS<sup>r</sup>m</i>	Stratagene (1996), Ditta <i>et al.</i> (1980)	LB + kan; 37°C	Helferstamm zur Transformation von <i>A. tumefaciens</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>				
C58CI		Chilton & Chilton (1984)	CPY + Rif. + Gent.; 28°C	Transformation von <i>A. thaliana</i>
<i>Pichia pastoris</i>				
KM71	<i>arg4 his4 aox1::ARG4</i>	Invitrogen	YPD- oder SD-Medium + His; 30°C	Überexpression der AAO1cDNA aus <i>A.thaliana</i>

#### 4.1.3. Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Selektion	Referenz	Verwendung
pGEM-T Easy	amp; Blue-White	Promega	PCR-Klonierung, Sequenzierung
pBluescript II SK+	amp; Blue-White	Stratagene	Klonierung, Sequenzierung
pRT101	amp	Töpfer <i>et al.</i> (1987)	35S-Expressions-Kassette
pRK2013	kan	Ditta <i>et al.</i> (1980)	vermittelt Triple-Mating + kan <sup>r</sup>
pMP90	gent	Deblaere <i>et al.</i> (1985)	trägt <i>vir</i> -Gene in C58CI
pBin19	kan; Blue-White	Bevan (1984)	Transformation in <i>A. thaliana</i>
pGA643	tet	?	Transformation in <i>A. thaliana</i>
pQE80	amp	Qiagen	Überexpression in <i>E.coli</i>
pPICZ	zeocin	Invitrogen	Überexpression in <i>P. pastoris</i>
pFF19/GFP	amp	Timmermans <i>et al.</i> , 1990	Lokalisierungs-Untersuchungen

Die hier genannten Plasmide bilden die Grundlage aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmid-Konstrukte und deren Subklone. Die Klonierungsschemata der jeweiligen Konstrukte sind in den entsprechenden Kapiteln dargelegt.

## **4.2. Molekularbiologische Standardmethoden**

### **4.2.1. Klonierungstechniken**

Zu den molekularbiologischen Standardmethoden zählen sämtliche Arbeiten an rekombinanter DNA auf Plasmidebene. Dies umfaßt im wesentlichen die Neukombination von DNA, d. h. die Bearbeitung von DNA mit Restriktionsenzymen oder anderen modifizierenden Enzymen zum Zweck der Subklonierung oder Umklonierung in andere Vektoren. Letzteres diente zumeist der Erzeugung von Konstrukten zur Expression von Genen in *E. coli* und *A. thaliana*.

Der Einsatz aller DNA-modifizierenden Enzyme, wie Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Klenow-Fragment und alkalische Phosphatase, erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller oder nach Sambrook *et al.* (1989). Die Transformation von Plasmid-DNA und Ligationsansätzen in *E. coli* sowie die Herstellung kompetenter *E. coli* DH5<sup>-</sup>-Zellen erfolgte ebenfalls nach Sambrook *et al.* (1989). Plasmid-DNA Minipräparationen wurden, je nach späterer Verwendung, entweder mit Hilfe der CTAB-Methode nach Del Sal (1989), der alkalischen Lyse nach Sambrook *et al.* (1989) oder mit Hilfe verschiedener Kits (Nucleo-Spin Plasmid, Macherey & Nagel; Qia-prep Mini, Qiagen) durchgeführt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen erfolgte ebenfalls nach Sambrook *et al.* (1989), DNA aus Agarosegelen wurde den Angaben der Hersteller entsprechend mit dem Easy-Pure<sup>TM</sup> Kit von Biozym oder dem Nucleo-Spin Extract Kit von Macherey & Nagel aufgereinigt.

### **4.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vielfältige Variationen der PCR zu z. T. sehr unterschiedlichen Zwecken angewandt, deren Anforderungen auch die Abwandlungen vom Standardprotokoll nach Sambrook *et al.* (1989) und die zu verwendende DNA-Polymerase vorgaben. In Fällen, in denen auf höchste Genauigkeit Wert gelegt werden mußte, wurde die Pwo-DNA-Polymerase mit 3' 5'-Exonuklease-Aktivität eingesetzt (Hybaid; Peqlab). Für einfache Nachweis-Reaktionen

konnte eine Taq-Polymerase eingesetzt werden (Promega; AGS-Gold von Hybaid), für alle RT-PCR Experimente hingegen wurde ein sehr prozessives und stabiles Gemisch aus Taq- und Pwo-Polymerase verwendet (Proof-Sprinter™ Kit, Hybaid). Für alle PCR-Experimente wurden die Thermocycler-Geräte „Gen Amp PCR-System 2400“ (Perkin-Elmer) bzw. „PCR-Express Gradient“ (Hybaid) eingesetzt.

#### 4.2.2.1. PCR-Mutagenese

Sowohl für die Erzeugung der pQE80-Expressionskonstrukte als auch für die Pflanzentransformations-Konstrukte war es notwendig, an definierten Positionen neue Restriktionsstellen in die cDNA einzubringen bzw. bestimmte Sequenzen spezifisch zu modifizieren. Hierzu wurden PCR-Amplifikationen mit mutagenisierenden Primern durchgeführt. In einem Volumen von 50 µl erfolgt die PCR-Reaktion in Gegenwart von 1 µM eines jeden Primers, 200 mM eines jeden Nukleotides, 20-50 ng Template-DNA und 2,5 U Pwo-DNA-Polymerase. Die Amplifikation erfolgte während 18-20 Zyklen, wobei einzelne Parameter wie Zyklenzahl, Annealingtemperatur und -dauer sowie Elongationszeit den jeweiligen Bedingungen angepaßt wurden. Das Standard-Protokoll für die Amplifikation von rekombinanter DNA setzte sich folgendermaßen zusammen: einmalige Denaturierung bei 94°C für 2 min; 18-20 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 56°C für 30 s und Elongation bei 72°C für 2 min; und eine abschliessende Endsynthese bei 72°C für 7 min.

#### 4.2.2.2. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR diente in dieser Arbeit der Erzeugung und Amplifikation der gesuchten *aba3* cDNA sowie der Analyse der *aba3*-Mutanten-Allele. Hierbei nutzt man die Fähigkeit der Reversen Transkriptase, in Gegenwart eines geeigneten 3'-Primers entlang einer mRNA-Matrize eine einzelsträngige DNA-Kopie zu synthetisieren. Diese kann in einer nachfolgenden PCR, der RT-PCR, amplifiziert werden und man erhält die intronfreie Sequenz der das Protein codierenden mRNA, repräsentiert durch die doppelsträngige cDNA. In einer RT-Standardreaktion wurden dazu 4-6 µg gesamt RNA bzw. 50-100 ng mRNA aus *Arabidopsis* eingesetzt. Diese wurde zunächst während 3 min bei 65°C denaturiert bevor 5 µM Oligo-dT Primer, 20 U RNase-Inhibitor (rRNasin, Promega), 500 mM eines jeden dNTPs und 10 U AMV-Reverse Transkriptase zu dem Gesamtansatz von 20 µl gegeben wurden. Die RT-Reaktion



fand statt für 2 h bei 41°C und wurde anschliessend mit TE-Puffer auf 250 µl aufgefüllt und somit abgestoppt. Die nachfolgende PCR wurde durchgeführt mit 0,5-3 µl der RT-Reaktion als Template, 2 µM jedes spezifischen Primers, 400 mM jeden dNTPs, 1,25 U Taq/Pwo-Gemisch in Gegenwart von 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1/100 Volumen Tween 20 und 1/50 Vol. DMSO in einem Endvolumen von 50 µl. Für die Amplifikation selbst mußte das Standardprotokoll den jeweiligen Ansprüchen angepaßt werden. In der Regel wurden 4-6 Parallelproben in einem Gradienten von unterschiedlichen Annealing-Temperaturen zwischen 50°C und 65°C in bis zu 50 Zyklen eingesetzt. Da in Gegenwart von Taq-Polymerasen hergestellte PCR-Amplifikate einen 3'-Adenin-Überhang besitzen, wurden RT-PCR Produkte direkt in sogenannte TA-Vektoren mit kompatiblen Thymin-Überhang wie pGEM-T Easy<sup>TM</sup> (Promega) kloniert.

#### 4.2.2.3. Fusions-PCR

Für die Mutagenisierung bzw. Eliminierung von Sequenz-Fehlern, die sich innerhalb einer cDNA befanden, wurde die Fusions-PCR eingesetzt. Hierbei werden zunächst zwei oder mehrere Teil-PCR-Fragmente erzeugt, die sich in den Bereichen überlappen, in denen es später zu einem Basenaustausch kommen soll. Üblicherweise werden die Überlapp-Bereiche durch den 5'-Primer des einen und den 3'-Primer des anderen Fragmentes gebildet. Beide Primer sind also komplementär zueinander und garantieren somit die spätere Fusion der beiden Teil-Fragmente an diesem Bereich. Außerdem enthalten sie an der selben Position die auszutauschende Base/n und stellen somit sicher, daß beide DNA-Stränge des Fusionates die neue Sequenz erhalten. Für die Fusions-PCR müssen die Teil-Fragmente zunächst gemeinsam denaturiert werden, damit die Einzelstränge der verschiedenen Teil-Fragmente miteinander paaren können. In Gegenwart von Nukleotiden und Pwo-Polymerase werden die fusionierten Einzelstränge zu Doppelsträngen aufgefüllt und nach Zugabe von endständigen Primern in ihrer vollen Länge amplifiziert. Ein typisches Protokoll für die Fusion von je ca. 20 ng Teil-Fragment-DNA durch 2,5 U Pwo-Polymerase und je 200 mM dNTP sieht nach 2 minütiger Denaturierung bei 94°C fünf Zyklen von je 30 s bei 94°C, 30 s bei 56°C, 2 min bei 72°C vor, bevor die endständigen Primer in Konzentrationen von je 1 µM zugegeben werden. Das Programm wird wie zuvor wiederholt, jedoch mit 15 Zyklen und einer abschliessenden Endsynthese von 7 min bei 72°C.

#### 4.2.2.4. Inverse PCR

Im Falle der T-DNA getaggten *aba3*-Mutante 13.5 aus *A. thaliana* bestand die molekulare Charakterisierung unter anderem in der Isolierung der den T-DNA Tag flankierenden unbekannten genomischen Bereiche. Das Prinzip der inversen PCR (iPCR) beruht darauf, das aus einem Bereich bekannter Sequenz heraus Bereiche unbekannter Sequenz amplifiziert werden. Da die in die 13.5 integrierte Sequenz aus dem Binärvektor pGBK5 stammt und bekannt ist, konnten Primer auf diese T-DNA generiert werden. Für die iPCR selbst wurden zunächst je 300 ng genomischer DNA der 13.5 Mutante mit BamHI bzw. EcoRI vollständig verdaut. Da beide Enzyme auch innerhalb der T-DNA schneiden war somit jeweils ein Ende der T-DNA klar definiert, am anderen mußte der flankierende genomische Bereich „hängen“. Nach Aufreinigung der Verdauung wurde die DNA in einem Volumen von 500 µl gelöst und Ligase zugegeben. Hierbei ist besonders das außergewöhnlich große Volumen wichtig, da Religationen einzelner Fragmente begünstigt, Ligationen von mehreren Fragmenten jedoch unterbunden werden müssen. Die nun zu einem großen Teil ringförmig vorliegende genomische DNA wurde erneut aufgereinigt und einer einfachen PCR unterzogen, wobei T-DNA spezifische Primer eingesetzt wurden, die jeweils an den Enden der T-DNA banden und die zwischen ihnen eingeschlossenen genomischen Bereiche amplifizierten. Je nach verwendetem Enzym und Primer-Paarung konnten so die die T-DNA rechts und links flankierenden genomischen Bereiche isoliert werden.

#### 4.2.2.5. Analytische PCR

Für die Analyse von transgenen Pflanzen und transformierten Agrobakterien wurde ebenfalls unter anderem die PCR-Technik herangezogen. Die zuvor präparierte DNA des zu untersuchenden Organismus wurde dabei einem Standardprotokoll unterzogen, das unter Verwendung von 1-2 U einer einfachen Taq-Polymerase lediglich der Abstimmung von Annealingtemperatur und Elongationszeit bedurfte. Im Falle von *Arabidopsis* wurden hierzu jeweils ca. 200 ng, für Agrobakterien ca. 50 ng genomische DNA eingesetzt.

### **4.2.3. Nachweis von Nukleinsäuren**

#### **4.2.3.1. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten**

Die zur radioaktiven Markierung eingesetzte DNA wurde über PCR-Amplifikation und Aufreinigung oder nach Restriktionsverdau und anschließender Extraktion aus Agarose-Gelen gewonnen. Die Markierung selbst erfolgte nach dem Prinzip des „random primed labeling“ nach Feinberg & Vogelstein (1984) unter Verwendung des „random primed DNA labeling Kits“ von Böhlinger. Die Radiochemikalie  $^{-32}\text{P}$ -dCTP wurde von Amersham/Pharmacia bezogen.

#### **4.2.3.2. Markierung von DNA-Fragmenten mit Fluorescein-11-dUTP**

Für die nicht-radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde Fluorescein-11-dUTP der Firma Amersham/Pharmacia mittels PCR in die zu markierende DNA eingebaut. Die Durchführung erfolgte nach einem Standard-PCR Protokoll, modifiziert nach Angaben des Herstellers.

#### **4.2.3.3. Southern-Blot Analyse (modifiziert nach Southern, 1975)**

Je 5 µg mit spezifischen Restriktionsendonukleasen verdaute genomische *Arabidopsis*-DNA wurde in einem 1 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und, wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben, in einem kapillarischen Alkali-Blot auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond<sup>TM</sup> N+, Amersham/Pharmacia) transferiert. Die Hybridisierung mit radioaktiven Sonden sowie das Waschen und Detektieren erfolgte gemäß Sambrook *et al.* (1989).

#### **4.2.3.4. Northern-Blot Analyse**

Für die Northern-Blot Analyse wurden je 20 µg *Arabidopsis* gesamt-RNA gemäß Sambrook *et al.* (1989) in einem formaldehydhaltigen 1,2%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und in einem kapillarischen Blot auf eine ungeladene Nylonmembran (Hybond<sup>TM</sup> N bzw. Hybond<sup>TM</sup> XL, Amersham/Pharmacia) transferiert. Die Hybridisierung mit Fluorescein-

markierten Sonden sowie das Waschen erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989), für die Detektion wurde der „Gene Image CDP-Star detection module kit“ (Amersham/Pharmacia) verwendet.

#### **4.2.3.5. DNA-Sequenzierung**

Für die DNA-Sequenzierung wurde stets hochreine über DNA-Isolationskits isolierte Plasmid-DNA (NucleoSpin Plasmid, Macherey & Nagel; Qia prep Mini, Qiagen) oder PCR-Amplifikat-DNA (NucleoSpin Extract, Macherey & Nagel) eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung von fluoreszenz-markierten ddNTPs des ABI-Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer) mit einem Pop 6 Polymer auf einem ABI-Prism™ 310 cycle sequencer (PE Applied Biosystems).

### **4.3. Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana***

Alle in dieser Arbeit verwendeten *aba3*-Mutanten (*aba3.1*, *aba3.2* und *13.5*) wurden freundlicherweise von Annie Marion-Poll vom „Institut National de la Recherche Agronomique“ (INRA) in Versailles zur Verfügung gestellt. Die korrespondierenden Wildtypen Columbia (Col-O), Landsberg erecta (Le) und Wassilewskija (Ws) lagen bereits vor.

#### **4.3.1. Pflanzenanzucht**

In gut durchnässter Aussaaterde (z.B. frux oder Compo) werden 20-100 *Arabidopsis*-Samen in kleinen Plastik-Pflanztöpfen ausgebracht. Die Töpfe werden zum Schutz gegen vorzeitiges Austrocknen mit Frischhalte-Folie abgedeckt oder in ein Mini-Gewächshaus gestellt. Nach einer 1-2 Tage dauernden Keimungsinduktion bei 4°C werden die Samen in einen Kulturschrank mit definierten Anzuchtbedingungen überführt. Hierzu diente in dieser Arbeit ein AR-36L *Arabidopsis* growth chamber (Percival Scientific). Die Kultivierung erfolgte in der Regel zunächst für ca. 2 Wochen unter Langtagbedingungen. Als solche waren 16 h Lichtphase bei 22°C und 8 h Dunkelphase bei 20°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75% bestimmt. Sobald die jungen Pflanzen ein kräftiges Rosettenstadium erreicht hatten, wurden

Kurztagbedingungen eingestellt, die als 9 h Lichtphase bei 22°C und 15 h Dunkelphase bei 20°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75% festgelegt waren.

Die Langtagpflanze *Arabidopsis* unterscheidet strikt zwischen Lang- und Kurztagbedingungen hinsichtlich der Blühinduktion. Während im Langtag die Blütenbildung zwischen dem 20. und 25. Tag eingeleitet wird, bleibt sie im Kurztag unterdrückt. Hier kommt es zu einem langandauernden vegetativen Wachstum mit einer ausgeprägten Rosettenbildung. Als problematisch gestaltete sich die gleichzeitige Anzucht von Wildtypen und Mutanten, da sich *aba3*-Mutanten unter anderem dadurch auszeichnen, daß sie aufgrund des Mangels an Abscisinsäure sowohl eine gestörte Stomataregulation besitzen als auch streßbedingt 5-10 Tage eher in die Blühphase übergehen als Wildtypen. Diesem wurde entgegengewirkt, indem Mutanten generell über einen möglichst langen Zeitraum bei höherer Luftfeuchte (ca. 90%) in einem Mini-Gewächshaus kultiviert wurden.

#### **4.3.2. DNA-Isolation aus *Arabidopsis*** **(modifiziert nach Murray & Thompson, 1980; in: Koncz *et al.*, 1992)**

Für die Isolation von genomischer DNA aus *Arabidopsis* wird zunächst 1 g frisches oder gefrorenes Blattmaterial in flüssigem Stickstoff sehr fein gemörsert, in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt und mit 2 Volumen 2x Extraktionspuffer [200 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1% CTAB; 0,7 M NaCl; 10 mM EDTA; 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol (frisch zugeben)] versetzt und stark gevortext. Unter gelegentlichem Schwenken wird die Probe für 90 min bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlen auf RT folgt eine Extraktion mit 4,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24/1, v/v) bevor die Oberphase in ein neues Röhrchen überführt und mit 10% CTAB (in 0,7 M NaCl, vorgewärmt auf 60°C) versetzt wird. Nach einer weiteren Extraktion wird die Oberphase mit 1 Volumen Fällungspuffer [50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1% CTAB; 10 mM EDTA] versehen und für 30 min bei RT inkubiert während es zur Präzipitation des DNA-CTAB-Komplexes durch Absenken der Salzkonzentration kommt.

Nach Zentrifugation (4300 upm, 15 min, RT) wird das Pellet in 450  $\mu$ l 1 M NaCl resuspendiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die DNA durch Zugabe von 900  $\mu$ l 96% EtOH erneut gefällt. Nach Pelletierung (15000 upm, 5 min, RT) wird die DNA 2x mit 70% EtOH gewaschen und das Pellet in 200  $\mu$ l TE gelöst. Es folgt die Degradation von RNA durch Zugabe von 1,5  $\mu$ l RNase A (10 mg/ml) für 15-30 min bei 37°C und eine Extraktion mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1, v/v/v). Für eine abschliessende Präzipitation gibt man 0,5 Volumen 7,5 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  und 3 Volumen 96% EtOH zur DNA-Lösung und

resuspendiert nach Zentrifugation das Pellet in 100 µl TE. Die erwartete Ausbeute an genomischer DNA aus 1 g Blattmaterial liegt bei 15-25 µg.

#### 4.3.3. Gesamt-RNA aus *Arabidopsis* (nach Logemann *et al.*, 1987)

Zur Isolierung von gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana* werden 0,1–1 g frisches oder tiefgefrorenes (–70°C) Pflanzenmaterial eingesetzt. Das Material wird zunächst unter Stickstoffkühlung in einem Mörser zu einem sehr feinen Pulver zermahlen und mit 2 Volumen RNA-Extraktionspuffer [20 mM MES, pH 7,0; 8 M Guanidinhydrochlorid; 20 mM EDTA in DEPC-H<sub>2</sub>O (5 µl/ml -Mercaptoethanol frisch zugeben)] versetzt (mind. 2 ml). Sobald das Gewebe gerade aufgetaut ist, wird es in zwei auf Eis vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zellreste werden abzentrifugiert (15000 upm, 5 min, 4°C) und die Überstände zu je ca. 750 µl auf drei neue vorgekühlte Reaktionsgefäße verteilt, die bereits 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1, v/v/v) enthalten. Das Gemisch wird sofort gründlich gevortext und erneut zentrifugiert (15000 upm, 5 min, 4°C). Nachdem die wässrige Oberphase in neue Reaktionsgefäße überführt worden ist, werden zur Fällung der RNA 1/20 Volumen 1 M Essigsäure und 0,7 Volumen 96% EtOH zugegeben, leicht geschüttelt und die RNA für mind. 30 min. bei 4°C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (15000 upm, 10 min, 4°C) wird das Pellet mit 1 Volumen 3 M NaOAc, pH 5,2 zur Entfernung der Polysaccharide gewaschen, indem man kräftig vortext bis sich das Pellet vom Rand löst und regelrecht zerbröselt, und erneut zentrifugiert (15000 upm, 15 min, 4°C). Der Überstand wird verworfen und die Waschung evtl. wiederholt. Das Pellet wird anschliessend mit 1 Volumen 70 oder 80%igem EtOH zum Entfernen der Salze gewaschen und zentrifugiert (15000 upm, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen, das neuerlich gewonnene Pellet in je 50–100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und die zuvor aufgeteilten Proben wieder vereinigt. Da sich RNA schlecht löst, erwärmt man gegebenenfalls für ca. 10 min auf 60°C. Sich nicht lösende Bestandteile des Pellets werden abzentrifugiert und verworfen. Zur Lagerung wird die RNA bei –70°C eingefroren.

#### **4.3.4.        *In planta*-Transformation von *Arabidopsis thaliana* durch Vakuuminfiltration (modifiziert nach Bechthold *et al.*, 1993)**

##### **4.3.4.1.        Vorbereitung von *Agrobacterium tumefaciens***

Mit Hilfe des Agrobakterien-vermittelten Gentransfers kann *Arabidopsis* gezielt mit sogenannter T-DNA transformiert werden (Feldmann & Marks, 1987; Valvekens *et al.*, 1988). Als solche wird der Teil eines Tumor-induzierenden (Ti) Plasmides von virulenten Agrobakterien-Stämmen bezeichnet, der nach erfolgter Infektion einer Pflanze durch *Agrobacterium* in das Pflanzengenom integriert. In der Praxis macht man sich dieses System nutzbar, indem die Tumor-induzierenden Gene des Ti-Plasmides entfernt und durch die eigenen Gene von Interesse ersetzt werden. Mit den für die Integration in das Pflanzengenom notwendigen Genen und Bereichen des Ti-Plasmides wird dann auch das Gen von Interesse stabil transformiert.

Die Klonierung eines für die Transformation geeigneten T-DNA Vektors ist demnach die Grundlage zur Agrobakterien-vermittelten Transformation von *Arabidopsis*. In dieser Arbeit sind die Binärvektoren pBin19 (Bevan, 1984) für die Klonierung des genomischen Bereiches von *aba3* und dessen Promotors sowie pGA643 für die Klonierung der *aba3*-cDNA unter Kontrolle des Blumenkohlmosaikvirus-Promotors 35S (Caulimoflower Mosaic Virus 35S; CaMV35S) verwendet wurden. Die entsprechenden Klonierungsschemata sind in den jeweiligen Kapiteln detailliert dargelegt.

Die fertiggestellten Binärvektoren werden schließlich unter Anwendung des „Triple Mating“ (Ditta *et al.*, 1980) und in Gegenwart des *E. coli*-Helferstammes HB101 mit pRK2013 in den Agrobakterien-Stamm C58CI transformiert. Dieser enthält das Plasmid pMP90, welches die für die Pflanzentransformation notwendigen Virulenzgene enthält und Gentamycin-Resistenz vermittelt (Deblaere *et al.*, 1985).

##### **4.3.4.2.        Kontrolle der Transformation von Agrobakterien**

Die nach dem Triple-Mating erhaltenen Agrobakterien-Klone sind in der Regel stets erfolgreich transformiert, müssen aber dennoch vor ihrer Weiterverwendung überprüft werden, da infolge von Neu-Arrangements der übertragenen DNA Teile der Konstrukte verloren gehen können. Hierzu isoliert man die Gesamt-DNA aus *Agrobacterium* mitsamt dem Binärvektor und retransformiert damit kompetente *E. coli*s oder führt eine analytische PCR durch.

1,5 ml einer 5 ml-Agrobakterien-Vorkultur werden pelletiert (6000 upm, 1 min, RT), das Pellet 2x mit je 500 µl 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 gewaschen und in 600 µl Agrobakterien-Extraktionspuffer [100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 1,5 M NaCl; 1% CTAB] resuspendiert. Zum Zellaufschluß werden zunächst 50 µl Proteinase K-Lösung (5 mg/ml) zugegeben und intensiv gemischt, bevor 160 µl 10% SDS-Lösung zugegeben, das Reaktionsgefäß vorsichtig geschwenkt und für 2 h bei 65°C inkubiert wird. Der Ansatz wird auf RT abgekühlt und mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1, v/v/v) extrahiert und abzentrifugiert (15000 upm, 20 min, 4°C). Die DNA in der Oberphase wird mit 0,6 Volumen Isopropanol präzipitiert (15000 upm, 20 min, RT) und in 20 µl TE resuspendiert.

Der Agrobakterien-DNA-Isolierung kann nun die Retransformation in *E. coli* und die anschließende Restriktionskontrolle bzw. Sequenzierung oder eine PCR folgen.

#### **4.3.4.3. Vorbereitung der Pflanzen**

Für die zur Transformation bestimmten Pflanzen werden 7 x 7 cm große Töpfe so mit Aussaaterde befüllt, daß die Erde ca. 1 cm hügelig über den Topfrand hinausragt. Die Töpfe werden mit Tüll überspannt, welcher mit Kreppband fixiert wird. Erst danach werden die Samen ausgebracht. Wie unter 4.3.1. beschrieben werden die Pflanzen für 2 Wochen unter Langtag-Bedingungen gehalten und dann bis auf 5-8 Pflanzen pro Topf vereinzelt. In den folgenden 3 Wochen beläßt man die Pflanzen unter Kurztagbedingungen, um kräftigen Wuchs zu gewährleisten. Nach insgesamt ca. 5 Wochen werden die gebildeten primären Infloreszenzen zurückgeschnitten ("Dekapitation"), was bei den Pflanzen eine verstärkte Bildung sekundärer Infloreszenzen induziert. Weitere 2-5 Tage nach dem Rückschnitt erfolgt die Vakuuminfiltration, wodurch die Meristeme der sekundären Infloreszenzen transformiert werden sollen.

#### **4.3.4.4. Vakuuminfiltration**

Mit Hilfe dieser Methode werden *Arabidopsis*-Pflanzen mit Agrobakterien infiziert, indem die Bakterien durch Unterdruck in die Interzellularen von meristematischen Zellen der Pflanzen gesogen werden. Dort soll die T-DNA mit dem Fremdgen auf Zellen der Keimbahn übertragen werden, da aus diesen später die Samenanlagen und Pollen hervorgehen. Wenn dies der Fall war, kann von auf diese Weise transformierten Pflanzen bereits die F1-Generation in Form transgener Samen geerntet werden.



### Lösungen:

CPY-Medium:	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
	Hefeextrakt	1 g/l
	Caseinpepton	5 g/l
	Saccharose	5 g/l
pH 7,0 mit NaOH einstellen. Das Festmedium enthält 1,5 % Agar.		

Infiltrationsmedium:	1/2 MS (Murashige-Skoog Salze und Vitamine)	
	Saccharose	50 g/l
	MES	0,5 g/l
	6-Benzylaminopurin	0,044 µM (10 µl/l einer 1 mg/ml-Stammlösung in DMSO)
	10% Triton X-100	0,5 ml/l (final 0,005 %)
pH 5,7 mit KOH einstellen.		

5 ml CPY-Medium mit entsprechenden Antibiotika werden mit einem Agrobakterien-Klon beimpft und für 2 Tage bei 28°C geschüttelt. Mit 1 ml dieser Vorkultur wird anschließend eine 400 ml CPY (+Antibiotika) Großkultur beimpft und für 24 h bei 28°C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> = 0,8 geschüttelt. Die Agrobakterien werden abzentrifugiert (4000 rpm, 15 min, RT), in 200 ml Infiltrations-Medium aufgenommen und gründlich suspendiert. Anschließend wird die Agrobakterien-Suspension in ein steriles 600 ml-Plastikbecherglas (Nalgene) überführt. Die zu transformierenden Pflanzen werden kopfüber in das Becherglas mit der Agrobakterien-Suspension geklemmt, so daß sie gerade eben in die Suspension eintauchen. Der möglichst geringe Kontakt mit der nährstoffreichen Lösung soll einer eventuellen späteren Pilzinfektion vorbeugen. Zusätzlich werden die Pflanzen einige Stunden vor der Transformation gut gewässert, um ein Aufsteigen der Lösung durch Kapillarkräfte zu verhindern.

In einem Exsikkator wird nun für 15 min bei der ersten, für 10 min bei allen weiteren Pflanzen, ein schwaches Vakuum von ca. 100 hPa angelegt, wodurch die Interzellularen der pflanzlichen Meristeme entgast werden. Zur Verminderung des Vakuums, das durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugt wird, wird ein mit Wasser gefülltes Ausgleichsgefäß zwischengeschaltet. Anschließend wird das Vakuum langsam aufgehoben. Durch den Druckausgleich wird die Agrobakterien-Suspension in die Interzellularen der Pflanze gesaugt. Um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen, werden die Pflanzen kurz auf Saugpapier gelegt.

Über Nacht werden die Pflanzen kopfüber in einem Petrischalenbeutel hängend bei RT mit den Bakterien kokultiviert. Zur Gewährleistung einer ausreichend feuchten Atmosphäre wird etwas Wasser in den Beutel gefüllt. Am darauffolgenden Tag werden die Pflanzen in die Klimakammer zurückgestellt. Zunächst bleiben sie jedoch in einem Minigewächshaus, um sich langsam wieder an die dort herrschende Luftfeuchtigkeit zu gewöhnen. Nach 1-2 Tagen werden die Pflanzen aus dem Minigewächshaus herausgenommen und bis zur Samenreife (ca. 4 Wochen) unter Langtag-Bedingungen kultiviert.

#### **4.3.4.5. Ernten von *Arabidopsis*-Samen**

Die vertrockneten Pflanzenstengel mit Blättern und Samenschötchen werden abgeschnitten und auf DinA 3-Papier gelegt. Das Papier wird nun mehrfach gefaltet und schließlich geknüllt, um die Samenschötchen aufzubrechen. Zum Trennen von Samen und Pflanzenresten wird ein Teesieb mit 0,4 mm Maschenweite benutzt, durch das die Samen mit einem Durchmesser von ca. 0,3 mm gerade hindurchfallen. Das Samenmaterial wird in 1,2 ml GC-Röhrchen abgefüllt und zum Trocknen in eine mit Silikagel ausgelegte, luftdicht verschlossene Kunststoffschale gestellt. Vor der weiteren Verwendung sollten die Samen mind. 1 Woche trocken gelagert worden sein.

#### **4.3.4.6. Sterilisation von *Arabidopsis*-Samen**

Um gerade geerntete oder unsteril gelagerte *Arabidopsis*-Samen *in vitro* auf MS-Medium zur Keimung zu bringen, müssen die Samen sterilisiert werden, da sie sonst sehr zügig von Pilzen überwachsen werden.

Ca. 500 Samen werden dazu in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit 750 µl zimmerwarmem 70% EtOH überschichtet, gemischt und 2-3 min inkubiert. Sobald sich die Samen vollständig wieder am Boden abgesetzt haben, wird der EtOH abgezogen und zu den Samen werden 750 µl 5% Na-Hypochloritlösung (NaOCl) mit 1/1000 Volumen 10% Triton X-100 gegeben. Dieser Ansatz wird für 5 min unter gelegentlichem Schütteln inkubiert und ein zweites Mal wiederholt. Um das NaOCl zu entfernen, werden die Samen nun 3-5x mit jeweils 750 µl sterilem dest. H<sub>2</sub>O gewaschen, bis kein Chlor-Geruch mehr wahrzunehmen ist. Zur Lagerung der sterilen Samen für einige Tage können diese in sterilem Wasser bei 4°C belassen werden; in der Regel werden sie jedoch sofort ausgebracht.

#### 4.3.4.7. Selektion transgener Pflanzen

Um transgene Pflanzen unter den vielen nicht-transgenen identifizieren zu können, ist der zur Transformation verwendete Binärvektor mit dem *nptII*-Gen versehen. Dieses kodiert für eine Neomycin-Phosphotransferase und verleiht transgenen Pflanzen Resistenz gegen Kanamycin. Unter geeigneten Selektionsbedingungen sollten daher die transgenen Pflanzen leicht von den nicht-transgenen unterschieden werden können.

Lösungen:

Selektionsmedium: 1/2 MS (Murashige-Skoog Salze und Vitamine;  
nach: Murashige & Skoog, 1962)  
MES 0,5 g/l  
Agar 8 g/l (0,8%)  
pH 5,7 mit KOH einstellen.  
Nach Autoklavieren 37,5 mg/l Kanamycin zugeben.

Bewurzelungsmedium: wie Selektionsmedium, nur mit 1,5% Agar.

Wie unter 4.3.4.6. beschrieben sterilisierte Samen werden nach dem letzten Waschschrift in 1 ml 0,15%iger steriler Agarose aufgenommen und gut gemischt. Pro Petrischale werden ca. 200 Samen auf 1/2 MS-Medium mit 0,8% Agar und 37,5 mg kan/l durch Auftropfen homogen verteilt. Unter der Sterilwerkbank läßt man die Platten nun für 15-30 min offen trocknen und inkubiert sie anschließend zur Synchronisation der Keimung für 1-2 Tage bei 4°C bevor die Pflanzen wie unter 4.3.1. beschrieben kultiviert werden.

Unter diesen Bedingungen sind nach 8-10 Tagen die Kotyledonen und eine lange Primärwurzel voll ausgebildet. Nicht-transgene Pflanzen bilden Nekrosen aus und sterben nach kurzer Zeit ab, da sie nicht die durch den Binärvektor verliehene Kanamycin-Resistenz besitzen. Transgene, d.h. kanamycinresistente Pflanzen haben nach 10-12 Tagen 1-2 Folgeblattpaare ausgebildet, und können auf ein zweites Selektionsmedium, gleichzeitig ein Bewurzelungsmedium, bestehend aus 1/2 MS mit 1,5% Agar und 37,5 mg kan/l, umgesetzt werden. Dieser zweite Selektionsschritt ist nicht unbedingt notwendig, jedoch empfehlenswert, um eventuell auftretende falsch-positive Pflanzen ("Escapes") zu eliminieren. Außerdem induziert die hohe Agar-Konzentration im zweiten Selektionsmedium zusätzlich die Ausbildung weiterer Seitenwurzeln.

Nach weiteren 1-2 Wochen werden die transgenen Pflanzen in Erde überführt und wie unter 4.3.1. kultiviert. Die Samen, die an diesen Pflanzen durch Selbstbestäubung entstehen, entsprechen der T2-Generation und lassen zu einem Viertel Wildtypen, zur Hälfte heterozygot transgene und zu einem weiteren Viertel homozygot transgene Pflanzen erwarten.

#### **4.3.4.8. Überprüfung transgener Pflanzen auf Fremdgenintegration**

Obwohl aufgrund der strengen Selektionsbedingungen keine falsch-positiven Pflanzen zu erwarten waren, wurden dennoch stichprobenhafte Überprüfungen der Fremdgenintegration mittels PCR- oder Southern-Analyse durchgeführt.

Grundlage der Analyse war stets die Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis* wie unter 4.3.2. beschrieben. Entsprechende Mengen der auf diese Weise präparierten DNA wurden zur PCR-Analyse wie unter 4.2.2.5. beschrieben, oder für die Southern-Analyse wie unter 4.2.3.3. beschrieben, eingesetzt.

#### **4.3.5. Nachweis von Enzymaktivitäten in *Arabidopsis***

Für die Charakterisierung der *Arabidopsis aba3*-Mutanten sowie der transgenen Linien wurden die Aktivitäten verschiedener Molybdoenzyme bestimmt: Aldehydoxidase- und Xanthindehydrogenase-Aktivität als Maß für die Aktivität von Monooxo-Mo-Hydroxylasen, denen in dieser Arbeit im Zusammenhang mit ABA3 eine besondere Bedeutung zukommt, und die Aktivität der zu den Dioxo-Mo-Hydroxylasen gehörenden NADH-abhängigen Nitratreduktase.

##### **4.3.5.1. Bestimmung der Nitratreduktase-Aktivität**

Die Bestimmung der Aktivität der NADH-abhängigen Nitratreduktase aus Pflanzen (EC 1.6.6.1) wurde nach Scheible *et al.* (1997) durchgeführt. Verwendet wurde dazu Blattmaterial von *Arabidopsis*, das nach der Ernte in flüssigem Stickstoff fein gemörsert und in 100 mg Aliquots vor der Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  schockgefroren wurde. Nach Zugabe von 4 Volumen frischem Extraktionspuffer [100 mM Hepes; 5 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ ; 1 mM EDTA; 10% Glycerol; 5 mM DTT;

1% BSA; 0,1% Triton X-100; 0,5 mM PMSF; 20  $\mu$ M FAD; 25  $\mu$ M Leupeptin; 5  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 1% PVPP; pH 7,5 mit KOH] wurden die Proben solubilisiert und auf Eis gestellt.

Zu 1 Volumen Reaktionspuffer [100 mM Hepes; 5 mM KNO<sub>3</sub>; 5 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,5 mM NADH; 10  $\mu$ M FAD; 15  $\mu$ M Leupeptin; 5  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; pH 7,5 mit KOH] wurden 0,16 Volumen Pflanzenextrakt gegeben und damit die Nitratreduktase-Reaktion gestartet. Nach 5, 10 und 15 min wurden je 0,3 Volumen des Reaktionsgemisches entnommen, durch Zugabe von Zn(OAc)<sub>2</sub> auf 50 mM gestoppt und reduziertes NADH nach Zugabe von PMS (50  $\mu$ M) oxidiert. Gebildetes Nitrit wurde nach Zugabe von je 0,3 Volumen 1% Sulfanilamid (in 3 M HCl) und 0,02% N-[Naphthyl-(1)]-ethylendiammoniumchlorid als roter Diazofarbstoff durch Messung der OD<sub>540</sub> nachgewiesen und über einen Nitrit-Standard (verdünnt in Nitrat-freiem Reaktionsansatz mit Pflanzenextrakt) quantifiziert.

#### **4.3.5.2. Nachweis der Aktivitäten von Aldehydoxidasen und Xanthindehydrogenase (modifiziert nach Koshiba *et al.*, 1996)**

Zum Nachweis der Aktivität pflanzlicher Aldehydoxidasen wurden zwischen 50 mg und 1 g frischen oder tiefgefrorenen Pflanzenmaterials eingesetzt. Mengen bis zu 200 mg wurden zum Zellaufschluß in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in Gegenwart von 2 Volumen Extraktionspuffer [100 mM Ka-Phosphatpuffer, pH 7,5; 2,5 mM EDTA; 5 mM DTT] unter Kühlung mit einem Dorn zerquetscht, Mengen über 200 mg dagegen in einem vorgekühlten Mörser in 2 Volumen kaltem Extraktionspuffer fein zerrieben und erst dann in Reaktionsgefäße überführt. Anschliessend wurden die Rohextrakte einer zweimaligen Behandlung im Ultraschallbad für je 30 s mit Zwischenlagerung auf Eis unterzogen und die Zellbestandteile durch Zentrifugation (15000 upm, 15 min, 4°C) schließlich pelletiert. Für die anschliessende Auftrennung im nativen, d.h. SDS-freien, 7,5%igen Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) wurden 50-500  $\mu$ g Protein aus Rohextrakten mit 1/10 Volumen 10x Ladepuffer [50% Glycerol; 0,02% Bromphenolblau (w/v)] aufgetragen. In Fällen, in denen das Volumen der aufzutragenden Protein-Lösung die Kapazität der Geltaschen überstieg, wurden die Rohextrakte zuvor durch Ammonium-Sulfat Präzipitation aufkonzentriert (AO und XDH präzipitieren bei 40%). Das Entfernen des Salzes über PD10-Säulen war nicht zwingend erforderlich. Die Gelelektrophorese verlief unter Kühlung für ca. 1,5 h bei 100 V oder für 3,5 h bei 75 V in einem Tris/Glycin-Laufpuffer bis die Ladepuffer-Lauffront die untere Kante des Gels erreicht hatte.

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele in 100 mM Ka-Phosphatpuffer, pH 7,5 für ca. 20 min äquilibriert, bevor die Färbelösung, bestehend aus 300  $\mu$ M Substrat (Abscisinaledehyd, Indol-

3-Carboxaldehyd, 1-Naphthaldehyd oder 1:1 Gemisch aus Indol-3-Carboxaldehyd und 1-Naphthaldehyd), 100  $\mu$ M PMS und 400  $\mu$ M MTT in 100 mM Ka-Phosphatpuffer, pH 7,5, zugegeben wurde. Die Färbung selbst wurde bei völliger Dunkelheit über Nacht bei RT durchgeführt. Die Färbereaktion wurde abgestoppt durch mehrmaliges Waschen der Gele mit Wasser.

Der Nachweis der Aktivität pflanzlicher Xanthindehydrogenasen verläuft im Prinzip analog dem von Aldehydoxidasen. Lediglich die Färbung verläuft unter Verwendung eines anderen Substrates, nämlich Hypoxanthin, in 250 mM Tris-HCl, pH 8,5.

## **4.4. Proteinbiochemische Arbeiten**

### **4.4.1. Biochemische Standardmethoden**

#### **4.4.1.1. Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E. coli***

Zur Überexpression wurden pQE80-Konstrukte in den *E. coli*-Stamm DH5 transformiert. Für eine Expressionskultur im kleinen Maßstab wurden 100 ml LB-Medium mit 5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur der entsprechenden Transformanten angeimpft und für 90 min bei 37°C bis zu einer  $OD_{600} = 0,5$  geschüttelt. Zur Induktion der Expression des Transgens wurde den Überexpressionskulturen anschliessend 0,5 mM IPTG zugegeben bevor sie für weitere 8-9 h bei 30°C unter Schütteln weiter inkubiert wurden. Dergleichen Expressionskulturen wurden in Maßstäben von bis zu 3 l durchgeführt.

Für die Aufarbeitung der Kulturen wurden diese zunächst pelletiert (8000 upm, 10 min, 4°C) und in Lysis-Puffer [50 mM  $NaP_i$ , pH 8,0; 300 mM NaCl; 10% Glycerol; 10 mM Imidazol] resuspendiert, wenn nötig vereinigt, und erneut gemeinsam pelletiert. Eine anschliessende Lagerung der Pellets bei -20°C verbesserte den folgenden Zellaufschluß, war aber nicht zwingend notwendig. Die auf Eis aufgetauten oder gleich weiterverarbeiteten Pellets wurden in Lysis-Puffer mit Lysozym (1 mg/ml) und 0,2 mM PMSF resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Sonifizieren wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (8000 upm, 30 min, 4°C), die Überstände in 50 ml-Zentrifugenbecher dekantiert und bei 22000 upm für 30 min bei 4°C erneut zentrifugiert. Die nun erhaltenen klaren Überstände konnten zur Western-Analyse oder für weitere Reinigungen eingesetzt werden.

#### 4.4.1.2. Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-Tag Proteinen

Zur Reinigung von His-getaggtten rekombinanten Proteinen aus Rohextrakten macht man sich die hochaffine Wechselwirkung zwischen Nickel (Ni)-Ionen und Polyhistidin-Resten an einer Nitrilo-tri-Acetat (NTA) Superflow Matrix (Qiagen) zunutze. Die Ni-Ionen werden von der NTA-Matrix komplexiert und dadurch immobilisiert. Nach dem Beladen der Säule mit dem Protein-Rohextrakt werden die verunreinigenden Proteine in mehreren Waschschritten weitgehend entfernt, während die His-getaggtten Proteine gebunden bleiben. Sie können schließlich durch einen Kompetitor, z.B. Imidazol, eluiert werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten 15 ml-Tropfsäulen wurden am Boden mit einer Fritte verschlossen und mit 1-3 ml Ni-NTA-Superflow-Matrix (Kapazität: 10 mg/ml) befüllt. Nach Absetzen der Matrix wurden diese mit einer weiteren Fritte bedeckt und die Säulen bei 4°C mit 10 ml Lysis-Puffer [50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 8,0; 300 mM NaCl; 10% Glycerol; 10 mM Imidazol] äquilibriert. Anschliessend wurden die Säulen mit wie unter 4.4.1. beschriebenen Protein-Extrakten beladen und nach Einsinken der Extrakte 2x mit 10 ml Waschpuffer [50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 6,0; 300 mM NaCl; 10% Glycerol; 20 mM Imidazol] gewaschen. Das His-getaggte Protein wurde schließlich durch sechsmalige Zugabe von je 1 ml Elutionspuffer [50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 6,0; 300 mM NaCl; 10% Glycerol; 500 mM Imidazol] von der Säule eluiert, wobei jede Fraktion separat aufgefangen und Aliquots davon in der SDS-PAGE analysiert wurden.

#### 4.4.1.3. Anionentauscher-Chromatographie

Eine Anionentauscher-Matrix besteht aus einem Trägermaterial, an welches positiv geladene funktionelle Gruppen kovalent gebunden sind. Da einzelne Proteine unter gegebenen Bedingungen eine unterschiedliche Netto-Ladung besitzen, binden sie mit unterschiedlicher Affinität an die Matrix. Die Fraktionierung erfolgt durch Elution mit einem linearen Gradienten eines Gegenions, das die gebundenen Proteine von der Matrix verdrängt. Die mit größerer Affinität bindenden Proteine eluieren dabei in späteren Fraktionen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die UNO Q-1-Säule (Biorad) und eine Niederdruck-Chromatographieranlage (FPLC; Pharmacia Biotech) benutzt. Als Medium wurde 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 (Puffer A) gewählt. Als Eluent diente Puffer A mit Zusatz von 1 M NaCl (Puffer B). Nach dem Probenauftrag wurde die Säule mit 10 ml Puffer A gewaschen, bevor die Elution mit einem steigenden Anteil an Puffer B (0-50 %) gestartet wurde. Der Gradient wurde in einem Volumen von 10 ml angelegt. Es wurden Eluatfraktionen von je 0,5 ml aufgefangen und in der SDS-PAGE analysiert.

#### **4.4.1.4. Gelfiltration**

Bei der Gelfiltration werden die Proteine an aus porösen Kügelchen bestehenden Matrices nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Wird eine Mischung von Proteinen unterschiedlicher Größe auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen, diffundieren die kleineren Proteine mit größerer Wahrscheinlichkeit in die Poren, wodurch ihre Elution gegenüber größeren Proteinen verzögert wird. Die Gelfiltration ist hoch reproduzierbar und kann daher auch zur Molekulargewichtsbestimmung eingesetzt werden. Zu diesem Zweck werden Eichgeraden mit Proteinen bekannter Größe erstellt.

Für die Molekulargewichtsbestimmung wurde in dieser Arbeit die Superdex 200 HR 10/30-Matrix (Amersham/Pharmacia) verwendet. Die Gelfiltration wurde mit Hilfe einer Niederdruck-Chromatographieanlage (FPLC) von Pharmacia Biotech durchgeführt. Die Säule wurde jeweils mit 100 µg Protein beladen und mit 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl (bzw. 300 mM NaCl), pH 8,0 bei einer Flußrate von 0,2 ml/min eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von je 0,5 ml aufgefangen und in der SDS-PAGE analysiert.

Für das Umpuffern bzw. Entsalzen von geringen Volumina in möglichst kurzer Zeit wurde die Gelfiltration an Sephadex G-25 und G-50 Matrices gewählt. Dabei kamen für Lösungen unter 400 µl vorgepackte Sephadex G-50 Nick-Säulen (Pharmacia) und für Volumina bis 2,5 ml vorgepackte Sephadex G-25 PD-10 Säulen (Pharmacia) zur Anwendung. Die Säulen wurden jeweils mit 5 Säulenvolumen des gewählten Puffers äquilibriert, mit der Probe beladen und die Differenz zum maximalen Probenvolumen an Puffer zugegeben. Die nun umgepufferte Proteinfraktion wurde mit 5/4 Volumen des Probenvolumens eluiert.

#### **4.4.1.5. Konzentrierung von Proteinlösungen**

Die Ankonzentrierung von Proteinlösungen kleiner Volumina bis 2 ml erfolgte mit Hilfe von Zentrifugations-Konzentratoren (Centricon 10/30, Amicon) mit einem Ausschlußvolumen von 10 und 30 kDa entsprechen den Angaben des Herstellers.

#### **4.4.1.6. Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes eines Rohextrakts erfolgte nach Bradford (1976) unter Verwendung von BSA (Rinder-Serum-Albumin Fraktion V) als Standard. Ein Aliquot von



5 µl des Rohextraktes wurde in 800 µl H<sub>2</sub>O verdünnt, mit 200 µl Bradford-Reagenz (Biorad; Roth) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert bevor die Absorption bei 595 nm in einem Spektralphotometer bestimmt wurde.

Die Konzentration gereinigter Proteine wurde mit Hilfe des kalkulierten molaren Extinktionskoeffizienten und des Molekulargewichts durch eine Absorptionsbestimmung bei 280 nm am Spektralphotometer nach Gill & Hippel (1990) ermittelt.

#### **4.4.1.7. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinfractionen entsprechend ihres Molekulargewichtes wurden in dieser Arbeit diskontinuierliche Tris/Glycin-SDS-Gelsysteme zwischen 7,5% und 12,5% nach Laemmli (1970) verwendet. Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden dazu vor der Gelelektrophorese mit 5x SDS-PAGE-Ladepuffer (50% Glycerol; 3,5% SDS; 15% -Mercaptoethanol; 0,02% Bromphenolblau) versetzt und für 5–7 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte unter Wasserkühlung bei 150-200 V, bis die Bromphenol-Front ca. 1 cm vor der unteren Kante des Gels angelangt ist.

Im Anschluß daran erfolgte eine Visualisierung der aufgetrennten Proteine im Gel über eine Färbung mit Coomassie-Lösung. Nach mind. 1-stündiger Inkubation unter Schütteln treten die Proteinbanden nach Behandeln mit Entfärber-Lösung vor dem sich abschwächenden Hintergrund hervor.

#### **4.4.1.8. Immunblot-Analyse**

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Gele für ca. 10 min in Transferpuffer (10% MeOH in 1x Tris/Glycin) äquilibriert. Für den Transfer der Proteine in einem diskontinuierlichen semi-dry-Blot auf die Trägermembran (Hybond<sup>TM</sup>-P, Amersham/Pharmacia; Roti<sup>®</sup>-PVDF, Roth) wurden 4 Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier luftblasenfrei auf die Apparatur gelegt bevor die Membran (zuvor mit MeOH benetzt, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in Transferpuffer äquilibriert) und weitere 4 Lagen Whatman-Papier aufgebracht wurden. Das Blotting erfolgte für ca. 40 min bei 250 mA (3 mA/cm<sup>2</sup>). Nach Waschen des Blots in 1x TBS-Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) können die transferierten Proteine reversibel mit PonceauS-Lösung (5% in 1x TBS) angefärbt werden.

Für den immunologischen Nachweis transferierter Proteine wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockierungslösung (2% BSA in 1x TBS) inkubiert bevor der 1:1000 in Blockierungslösung verdünnte primäre Antikörper zugegeben wurde. Nach ca. 2-stündiger Inkubation bei RT unter Schwenken wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen der Membran für je 8 min in TBSTXS (0,1% BSA; 0,1% Triton X-100; 0,05% SDS; in 1x TBS) und einmaliges Waschen für 10 min in 0,8% NaCl entfernt. An eine erneute 5-minütige Blockierung schloß sich die Inkubation mit dem sekundären mit Alkaliner Phosphatase konjugierten Antikörper Anti-Maus-IgG (Sigma) für weitere 1,5 h bei RT unter Schwenken an. Nach erneutem Waschen mit TBSTXS und 0,8% NaCl folgte die Färbereaktion der alkalischen Phosphatase durch eine Benetzung der Membran mit ca. 5 ml BCIP/NBT-Reaktionslösung (100 mM Tris-HCl, pH 8,8; 100 mM NaCl; 6,4 mM MgCl<sub>2</sub>) nach Zugabe von 66 µl NBT/10 ml (Promega) und 33 µl BCIP/10 ml (Promega). Durch Entfernen der Färbelösung und Waschen mit Wasser wurde die Reaktion gestoppt.

In dieser Arbeit wurden als primäre Antikörper der monoklonale Anti-His-Tag Antikörper aus Maus (Dianova) für die Arbeiten mit rekombinanten His-getaggtten Proteinen sowie der polyklonale gegen ABA3 gerichtete Antikörper aus Kaninchen (BioScience) für Arbeiten mit *Arabidopsis*-Rohextrakten verwendet.

#### 4.4.2. Spezielle Methoden

##### 4.4.2.1 Expressionssystem *Pichia pastoris*

Da nicht immer alle posttranslationalen Modifikationen eukaryontischer Proteine im prokaryontischen Expressionssystem *E. coli* vollzogen werden können, greift man in solchen Fällen auf eukaryontische Expressionssysteme wie das der einzellige Hefe *Pichia pastoris* zurück. Auch hier sind, ähnlich wie bei *E. coli*, relativ kurze Generationszeit und leichte Kultivierbarkeit gewährleistet, jedoch bietet dieses System den Vorteil einer der *in vivo*-Situation angepaßteren Expression.

*P. pastoris* ist als methylotrophe Hefe in der Lage, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Dabei wird Methanol von zwei Isoformen des Enzyms Alkohol-Oxidase (AOX1 und AOX2) unter Sauerstoffverbrauch zu Formaldehyd oxidiert, wobei als Nebenprodukt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entsteht. Zum Schutz vor Radikalbildung muß diese Reaktion in den Peroxisomen stattfinden. Während der Metabolisierung von Methanol in *P. pastoris* stellt die AOX1 die außergewöhnlich hohe Menge von ca. 30% aller löslichen Proteine. Dieses bedarf eines entsprechend starken

Promotors, dessen hohe Expressionsrate und Methanol-Induzierbarkeit in Abwesenheit von Glucose man sich für die Fremdgenexpression in *P. pastoris* in Form des pPICZ-Vektor Systems (Invitrogen) zunutze macht. Dieser Vektor ist nur in *E. coli* replizierbar, in *P. pastoris* ist die Integration in das Genom Voraussetzung für dessen Vervielfältigung. In beiden kann jedoch mit Hilfe des *sh ble*-Gens auf Zeocin<sup>TM</sup> (Invitrogen) selektiert werden. Durch eine C-terminale Fusion des zu exprimierenden Proteins mit einem His-Tag wird die spätere Aufreinigung des getaggtten Proteins über eine Ni-NTA-Matrix ermöglicht. Um die stabile Integration des Vektors ins Genom der Hefe zu ermöglichen, muß ein pPICZ-Konstrukt vor der Transformation in *P. pastoris* im Bereich des AOX1-Promotors linearisiert werden. In der Regel kommt es durch homologe Rekombination mit einem single-crossover zu einer Integration der rekombinanten DNA im 5'-Bereich des AOX1-Gens.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aldehydoxidase AAO1 aus *A. thaliana*, die als Homodimer die AO stellt, in *Pichia* exprimiert. Der *P. pastoris* Mut<sup>S</sup> (Methanol utilisation slow)-Stamm KM71 (Invitrogen), transformiert mit pPICZ-AAO1 und ausführlich beschrieben durch Koiwai *et al.* (2000), wurde freundlicherweise von Professor Tomokazu Koshiba von der Tokyo Metropolitan University in Japan zur Verfügung gestellt. Das AOX1-Gen ist hier durch eine Insertion zerstört, so daß Methanol nur noch durch die Isoform AOX2 metabolisiert werden kann, was zu deutlich verzögertem Wachstum führt.

#### 4.4.2.2. Überexpression der Aldehydoxidase AO $\alpha$ aus *Arabidopsis* in *Pichia pastoris*

Vor der Induktion der Fremdgenexpression mit Methanol muß *P. pastoris* in einem Medium mit Glycerol als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert werden. Durch das Fehlen von Glucose kommt es dabei zu einer Derepression des AOX1-Promotors. Erst nach Erreichen der gewünschten Zelldichte werden die Zellen in Methanol-haltiges Minimalmedium überführt. Da die oben beschriebene Metabolisierung von Methanol O<sub>2</sub>-abhängig ist, muß die Kultur von diesem Zeitpunkt an gut belüftet werden.

Lösungen:

YPD-Medium:	20 g/l	Pepton
	10 g/l	Hefe-Extrakt
	pH 5,8 einstellen, auf 950 ml auffüllen und autoklavieren.	
	Festmedium enthält 1,8% Agar.	
	50 ml	40%ige Glucose (sterilfiltriert) zugeben

BMGY-Medium:	20 g/l	Pepton
	10 g/l	Hefe-Extrakt
	autoklavieren und folgende sterile Lösungen zugeben:	
	100 ml/l	1 M Kalium-Phosphatpuffer, pH 6,0
	100 ml/l	10x YNB (Yeast-Nitrogen-Base mit Ammonium Sulfat und Aminosäuren; 134 g/l Stammlösung)
	2 ml/l	500x Biotin (20 mg/100 ml Stammlösung)
	100 ml/l	10x Glycerol (10% Glycerol-Stammlösung)
BMMY-Medium:	wie BMGY-Medium, jedoch statt 10x Glycerol werden 5 ml Methanol/l und 0,3 mM Na-Molybdat zugegeben.	

Für eine Vorkultur wird Zellmaterial (etwa 50 µl) einer YPD-Agarplatte in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 1 ml BMGY-Medium überführt und resuspendiert, um damit 250 ml BMGY-Medium mit Antibiotikum in einem 1 l-Kolben anzuimpfen. Die sich dabei leicht trübende Kultur wird für 16 h bei 28-30°C und 125 rpm inkubiert. Anschließend werden die Zellen in 50 ml-Röhrchen bei 3000 x g für 5 min pelletiert und durch Vortexen in 100 ml BMMY-Medium mit Antibiotikum resuspendiert. Die Zellsuspension wird nun um eine gute Belüftung zu gewährleisten in einen 1 l Erlenmeyer-Kolben mit Schikane überführt und mit zwei Lagen Gaze verschlossen. Das Kulturvolumen sollte nicht mehr als 15% des Kolbenvolumens betragen. Nach einer Inkubation für 12 h bei 28-30°C und 125 rpm werden die Zellen durch Zentrifugation bei 7000 x g für 10 min pelletiert. Es empfiehlt sich, eine Kultur dieser Größenordnung in zwei 50 ml-Röhrchen zu pelletieren, da dies die spätere Proteinextraktion erleichtert. Die Zellpellets werden bei -70°C gelagert.

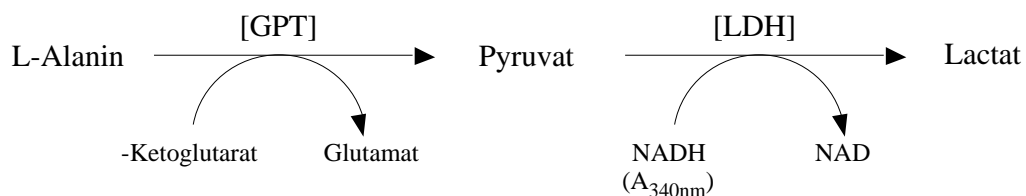
#### 4.4.2.3. Extraktion von Proteinen aus *Pichia pastoris*

Die Hefe-Pellets aus 4.4.2.2. werden auf Eis aufgetaut und 1:1 (v/v) mit säuregewaschenen Glasperlen versetzt, bevor 3 ml Lysis-Puffer [50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,4; 1 mM EDTA; 5% Glycerol] mit 0,2 mM PMSF/50 ml Expressionskultur (unmittelbar vor Gebrauch zugeben) zugegeben werden. Der Zusatz eines Proteaseinhibitors soll die Proteindegradation minimieren. Für den mechanischen Aufschluß der Zellen werden diese nun 30x für je 30 s gevortext und zwischen den Vortex-Schritten für je 30 s auf Eis belassen. Im Anschluß daran werden die

Glasperlen während 5 min bei 4000 x g und 4°C pelletiert, die Überstände in einem frischen Gefäß vereinigt und bei 40000 x g und 4°C für 30 min erneut zentrifugiert. Das nun klare Lysat wird vorsichtig abgenommen und kann einer Ni-NTA-Aufreinigung über Tropfsäulen, wie unter 4.4.1.2. beschrieben, unterzogen werden.

#### 4.4.2.4. Enzymatischer Nachweis von L-Alanin

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis des durch ABA3 aus L-Cystein gebildeten L-Alanins herangezogen. Die Aminosäure L-Alanin kann hiermit indirekt durch zwei nacheinander ablaufende enzymatische Reaktionen nachgewiesen werden (Zheng *et al.*, 1993). In der ersten Reaktion wird durch eine Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) eine Aminogruppe von L-Alanin auf  $\alpha$ -Ketoglutarat übertragen, wobei Glutamat und Pyruvat entstehen (Abb. 4.1.). Das gebildete Pyruvat kann in der anschließenden Reaktion unter NADH-Verbrauch durch das Enzym Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu Lactat reduziert werden. Die Reaktionskinetik wird durch Messung der NADH-Absorptionsabnahme bei 340 nm verfolgt.



**Abb. 4.1. Reaktionsablauf des gekoppelten enzymatischen L-Alanin-Nachweises.** Durch ABA3 aus L-Cystein gebildetes L-Alanin wird durch die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) zu Pyruvat umgesetzt. Die gleichzeitige Übertragung einer Aminogruppe des L-Alanins auf  $\alpha$ -Ketoglutarat läßt parallel Glutamat entstehen. In einer zweiten Teilreaktion wird das Pyruvat durch die Lactatdehydrogenase (LDH) reduziert und Lactat gebildet. Während der dabei stattfindenden Oxidation von NADH zu NAD kann die Absorptionsabnahme von NADH bei 340 nm verfolgt werden, was nun mit Hilfe von geeigneten Standards als Maß für die Menge des zuvor gebildeten L-Alanins steht.

Die Spezifität der eingesetzten Enzyme gewährleistet einen zuverlässigen Nachweis von L-Alanin in der mM-Größenordnung. Für quantitative Messungen werden L-Alanin-Standardlösungen von mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen zum Erstellen einer Eichkurve verwendet.

Für die Messung wurden 200  $\mu$ g ABA3 zunächst in 400  $\mu$ l Gesamtvolumen (20 mM Tris-HCl, pH 8,0) mit 1 mM L-Cystein und ggf. 1 mM DTT für 1 h bei 30°C inkubiert. Die

niedermolekulare Fraktion für den L-Alanin-Nachweis wurde nach Ultrazentrifugation der Reaktionen mit Centricons (MWCO=3-10 kDa, Millipore) erhalten. 300 µl des Durchflusses wurden danach mit 10 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat und 1 Unit Glutamat-Pyruvat-Transaminase für 1 h bei 37°C inkubiert während in der Zwischenzeit die LDH-Lösung für den Pyruvat-Nachweis vorbereitet wurde [750 µl H<sub>2</sub>O + 250 µl 1 M Tris-HCl, pH 9,3 + 18 U LDH; auf Eis]. Im Anschluß wurden 250 µl der GPT-Reaktion mit der LDH-Lösung vermischt und unmittelbar vor der Messung auf 30°C erwärmt. Das Reaktionsgemisch wurde in eine Küvette überführt und die Reaktion im Spektralphotometer durch Einpipettieren von 250 µl 0,58 mM NADH-Lösung und zügiges Mischen durch Auf- und Abpipettieren gestartet. Die Messung der NADH-Abnahme erfolgte für 90 s bei 340 nm. Die Meßdaten wurden per Computer aufgezeichnet und ausgewertet. Als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit diente die Steigung der Absorptionskurve, welche für den linearen Bereich der Reaktion bestimmt wurde.

#### 4.4.2.5. Inhibierung von ABA3 durch Alkylierung mit N-Ethylmaleimid

Aus der Aminosäure-Primärsequenz von ABA3 kann ersehen werden, daß in einer der konservierten Regionen ein Cysteinyl-Rest besonders hervortritt (C430), für den in NifS-Proteinen eine essentielle Funktion während der Cystein-Desulfurierung beschrieben werden konnte (Zheng *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1994). Mit Hilfe von thiol-spezifischen alkylierenden Reagenzien wie N-Ethylmaleimid (oder Iodoacetat) sollte gezeigt werden, ob die Alkylierung dieses und/oder anderer Cysteinyl-Reste von ABA3 dessen Cystein-Desulfurase-Aktivität beeinflußt.

Hierzu wurden 350 µg ABA3 (3,5 nmol) mit einer äquimolaren Menge bzw. einem vierfachen Überschuß an N-Ethylmaleimid (N-EM) in 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,0 und in Gegenwart von 1 mM DTT für 3 h bei 30°C inkubiert. Als Referenz wurde eine N-EM-freie Probe mitgeführt. Nach der Inkubation wurde das alkylierende Reagenz über eine Nick-Säule entfernt. Anschließend wurden 200 µg des Proteins für die Bestimmung der Cystein-Desulfurase-Aktivität, wie in 4.4.2.5. beschrieben, herangezogen. Die Steigung des Kontroll-Ansatzes mit unbehandeltem Protein wurde als Cystein-Desulfurase-Aktivität von 100% vorbestimmt.

#### 4.5. Erzeugung von transient transgenen Pflanzen mittels Partikel-Kanone zur Untersuchung der Kern-Lokalisierung von ABA3

Mit der Partikel-Kanone steht eine Technik zur Verfügung, die es ermöglicht, DNA-Konstrukte direkt in pflanzliche Zellen zu transportieren (Sanford, 1988). Hierbei wird die DNA an Mikrocarrier, d. h. Goldpartikel von 0,5 - 2 µm Durchmesser, gebunden und durch Druck zusammen mit diesen so stark beschleunigt, daß sie in das pflanzliche Gewebe eindringen. Bedingt durch die große Menge der transformierten DNA kommt es auch zu einer ein bis zwei Tage andauernden, also vorübergehenden (transienten), Expression der DNA in den betroffenen Zellen. Während dieser Zeit kann die Expression visualisiert werden, sofern ein Reportergen mittransformiert wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das GFP (Green-Fluorescent Protein) verwendet, um die Lokalisierung von ABA3 zu untersuchen. Hierzu wurde ein Fusionskonstrukt aus dem GFP des bereits vorliegenden Vektors pFF19/GFP (Timmermans *et al.*, 1990) und dem C-Terminus von ABA3 hergestellt, innerhalb welchem Signaturen für eine Kern-Lokalisierung gefunden wurden. Für die Analyse wurde das neue Konstrukt in Tabak-Blätter (*Nicotiana tabacum*) "geschossen" und nach ein bis zwei Tagen die Expression des GFP im Fluoreszenz-Mikroskop untersucht.

##### 4.5.1. Vorbereitung des Pflanzenmaterials und Coating der Goldpartikel mit DNA

Von kräftigen, adulten Tabak-Pflanzen aus Erdkulturen werden die oberen Blätter entfernt und mit der Unterseite nach oben auf Filterpapier gelegt, welches sich in einer Petrischale befindet und mit MSoW-Medium (Medium nach Murashige-Skoog, 1962; jedoch ohne Wachstumsfaktoren) getränkt ist. Die Blätter sollen planeben auf dem Filterpapier aufliegen, um eine gleichmäßige Transformationseffizienz zu gewährleisten.

Für das Beladen (Coating) der Goldpartikel mit der zu transformierenden DNA wird folgendes Protokoll verwendet (6-Schuß Ansatz):

Drei mg Gold werden in 200 µl 70% EtOH aufgenommen und ca. 20 s gevortext. Wenn das Gold homogen verteilt ist, wird der Ansatz für 5 bis 10 min stehen gelassen. Der Ansatz wird danach für 30 s bei 4000 upm zentrifugiert, wobei die Bremse beim Erreichen der Sollzahl ausgeschaltet wird, um ein Aufwirbeln des Pellets nach der Zentrifugation zu vermeiden. Das Pellet wird in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut für 10 min stehen gelassen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 1500 upm für 15 s wird das Pellet in 100 µl 50% Glycerol resuspendiert und auf Eis gestellt. 5 bis 10 µg DNA (ca. 0,5 bis 1 µg/µl) werden zugegeben, mit der Pipettenspitze gemischt und für weitere 10 - 15 min auf Eis belassen. Anschließend werden 100 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub>

zugegeben und gemischt, bevor nach einer weiteren Minute 0,1 M Spermidin zugefügt wird und man die Partikel auf Eis für ca. 10 min absinken läßt. Durch kurzes Anzentrifugieren (5 s) werden die Partikel pelletiert und in 200 µl 70% EtOH aufgenommen (nicht vortexen). Nach zweimaligem Waschen mit 200 µl 96% EtOH (je ca. 5 s anzentrifugieren) werden die in 100 µl 96% EtOH Partikel aufgenommenen Partikel im Wasserbad für 2-3 s ultrabeschallt. Schließlich werden die sogenannten "flying discs" mit je 5 µl des Coatingansatzes beladen und für 5 min im Exsikkator getrocknet. Aus den DNA-beladenen Gold-Partikeln (Mikrocarrier) und den "flying discs" sind nun die Makrocarrier entstanden.

#### **4.5.2. Transformation des Pflanzenmaterials**

Die Transformation der Tabak-Blätter wird mittels Partikel-Kanone durchgeführt. In der Kanone werden die mit der DNA beladenen Makrocarrier umgedreht in einem Abstand von 2 cm unter einer Gas-Austrittsöffnung plziert. Aus dieser entweicht schockartig ein durch zwei Berstscheiben auf 800 psi eingestellter Helium-Gasstrom und beschleunigt den Makrocarrier in Richtung der sich unter ihm befindenden Petrischale mit dem Pflanzenmaterial. Nach einem cm wird der Makrocarrier jedoch durch ein metallenes Fangnetz rapide abgestoppt, wodurch sich die Mikrocarrier vom Makrocarrier ablösen. Die Mikrocarrier allein passieren die Maschen des Netzes und fliegen nahezu ungebremst weiter. Ihre kinetische Energie beim Auftreffen auf das Zielgewebe reicht aus, die Zellwände zu durchschlagen und in das Innere der Zellen zu gelangen.

Nach dem Beschuß des Blattmaterials wird dieses für weitere ein bis zwei Tage unter den ursprünglichen Kultur-Bedingungen inkubiert. Während dieser Zeit wird das in das Pflanzenmaterial eingebrachte Fremdgen exprimiert und gegebenenfalls an seinen Bestimmungsort im entsprechenden Organell transportiert.

#### **4.5.3. Analyse des transient transformierten Pflanzenmaterials**

Ein bis zwei Tage nach der Transformation wird den beschossenen Blättern mit einer sehr feinen Pinzette die Epidermis abgezogen, um den für die mikroskopische Analyse nachteiligen Einfluß der Epidermis zu beheben. Mit Hilfe einer 10- bis 40fachen Vergrößerung kann nun im Fluoreszenz-Mikroskop die Expression im allgemeinen und die subzelluläre Lokalisierung im speziellen untersucht werden.



## 5. Literaturverzeichnis

- Akaba, S.**, Leydecker, M.-T., Moureaux, T., Oritani, T. and Koshiba, T. (1998): Aldehyde oxidase in wild type and *abal* mutant leaves of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Cell Physiol.* **39** (12), 1281-1286.
- Akaba, S.**, Seo, M., Dohmae, N., Takio, K., Sekimoto, H., Kamiya, Y., Furuya, N., Komano, T. and Koshiba, T. (1999): Production of homo- and hetero-dimeric isozymes from two aldehyde oxidase genes of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biochem.* **126**, 395-401.
- Alikulov, Z.A.** & Mendel, R.R. (1984): Molybdenum cofactor from tobacco cell cultures and milk xanthine oxidase: Involvement of sulfhydryl groups in dimerization activity of cofactor. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **179**, 693-705.
- Amrani, L.**, Primus, J., Glatigny, A., Arcangeli, L., Scazzocchio, C. and Finnerty, V. (2000): Comparison of the sequences of the *Aspergillus nidulans* *hxB* and *Drosophila melanogaster* *ma-l* genes with *nifS* from *Azotobacter vinelandii* suggests a mechanism for the insertion of the terminal sulphur atom in the molybdopterin cofactor. *Mol. Microbiol.* **38** (1), 114-125.
- Bechtold, N.**, Ellis, J., Pelletier, G. (1993): *In planta* *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C.R.Acad. Sci. Paris, Life Sciences* **316**, 1194-1199.
- Beedham, C.** (1985): Molybdenum hydroxylases as drug metabolizing enzymes. *Drug Metab. Rev.* **16**, 1119-1156
- Bevan, M.** (1984): Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acid Research* **12**, 8711-8721.
- Bittner, F.**, Oreb, M. and Mendel, R.R. (2001): ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276** (44), 40381-40384.
- Bogaart, A.M.** & Bernini, C.F. (1981): The molybdoenzyme system of *Drosophila melanogaster*. I. Sulfite oxidase: Identification and properties. Expression of the enzyme in *maroon-like*, (*ma-l*), *low-xanthine dehydrogenase* (*lxd*) and *cinnamon* (*cin*) flies. *Biochem. Genet.* **19**, 929.
- Bordas, J.**, Bray, R.C., Garner, C.D., Gutteridge, S. and Hasnain, S.S. (1980): X-ray absorption spectroscopy of xanthine oxidase. The molybdenum centres of the functional and the desulpho forms. *Biochem. J.* **191**, 499-508.
- Bouchez, D.**, Camilleri, C. and Caboche, M. (1993): A binary vector based on Basta resistance for *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences* **316**, 1188-1193.
- Boyington, J.C.**, Gladyshev, V.N., Khangulov, S.V., Stadtman, T.C. and Sun, P.D. (1997): Crystal structure of formate dehydrogenase H: Catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine and an Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> cluster. *Science* **275**, 1305-1308.
- Bradford, M.M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramme quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Chandler, P.M.** & Robertson, M. (1994): Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 113-141.
- Chilton, W.S.** & Chilton, M.D. (1984): Mannityl opine analogs allow isolation of catabolic pathway regulatory mutants. *J. Bacteriol.* **158**, 650-658.
- Chovnick, A.**, Finnerty, V., Schalet, A. and Duck, P. (1969): Studies on genetic organization in higher organisms: I. Analysis of a complex gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **62**, 145-169.
- Cohen, H.J.**, Fridovich, I., Rajagopalan, K.V. (1971): Hepatic sulfite oxidase. A functional role for molybdenum. *J. Biol. Chem.* **246**, 374-382.
- Coughlan, M.P.** (1980): Molybdenum and molybdenum containing enzymes. Pergamon Press. Oxford.
- Courtright, J.B.** (1967): Polygenic control of aldehyde oxidase in *Drosophila*. *Genetics* **57**, 25-39.
- Cove, D.J.** & Pateman, J.A. (1963): Independently segregating genetic loci concerned with nitrate reductase activity in *Aspergillus nidulans*. *Nature* **198**, 262-263.
- Covey, S.-N.**, Lomonosoff, G.P. and Hull, R. (1981): Characterization of cauliflower mosaic virus DNA sequences which encode major polyadenylated transcripts. *Nucleic Acid Res.* **9**, 6735-6747.

- Deblaere, R.**, Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. and Leemans, J. (1985): Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acid Res.* **13**, 4777-4788.
- Del Sal, G.**, Manfioletti, G. and Schneider, C. (1989): The CTAB-DNA precipitation method: A common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *BioTechniques* **7**, 514-519.
- Ditta, G.**, Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D.R. (1980): Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7347-7351
- Eilers, T.**, Schwarz, G., Brinkmann, H., Witt, C., Richter, T., Nieder, J., Koch, B., Hille, R., Hänsch, R. and Mendel, R.R. (2001): Identification and biochemical characterization of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase. A new player in plant sulfur metabolism. *J. Biol. Chem.* **276** (50), 46989-46994.
- Enroth, C.**, Eger, B.T., Okamoto, K., Nishino, To., Nishino, Ta. and Pai, E.F. (2000): Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (20), 10723-10728.
- Feinberg, A.P.** & Vogelstein, B. (1984): A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Addendum. Anal. Biochem.* **137**, 266-267.
- Feldman, K.A.** & Marks, M.D. (1987): *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 1-9
- Finnerty, V.** (1976): Genetic units of *Drosophila* - simple cistrons. In: Genetics and Biology of *Drosophila*, Vol. 1B, Chap. 18. Ashburner, M. and Novitski, E. (eds). New York: Academic Press, 721-765.
- Forrest, H.S.**, Glassman, E. and Mitchell, H.K. (1956): Conversion of 2-amino-4-hydroxypteridine to isoxanthopterin in *Drosophila melanogaster*. *Science* **124**, 725-726.
- Forrest, H.S.**, Hanley, E.W. and Lagowski, J.M. (1961): Biochemical differences between the mutants *rosy-2* and *maroon-like* of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **46**, 1455-1463.
- Gardner, R.C.**, Howarth, A.J., Hahn, P., Brown-Luedi, M., Shepherd, R.J. and Messing, J. (1981): The complete nucleotide sequence of an infectious clone of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing. *Nucleic Acid. Res.* **9**, 2871-2888.
- Gill, G.C.** & Hippel, P.H. (1989): Calculation of protein extinction coefficient from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Gilmour, S.J.** & Thomashow, M.F. (1991): Cold-acclimation and cold-regulated gene expression in ABA-mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **17**, 1233-1240.
- Glassman, E.** & Pinkerton, W. (1960): Complementation at the maroon-like eye-color locus of *Drosophila melanogaster*. *Science* **131**, 1810-1811.
- Grebenok, R.C.**, Pierson, E., Lambert, G.M., Gong, F.-C., Alfonso, C.L., Haldeman-Cahill, R., Carrington, J.C. and Galbraith, D.W. (1997): Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *The Plant Journal* **11** (3), 573-586.
- Gupta, U.C.** (ed) (1997): Molybdenum in Agriculture. Cambridge University Press.
- Hanahan, D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557.
- Hartley, M.J.** (1970): Contrasting complementation patterns in *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res.* **16**, 123-125.
- Heino, P.**, Sandman, G., Lång, V., Nordin, K. and Palva, E.T. (1990): Absciscic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* **79**, 801-806.
- Heuer, B.**, Plaut, Z. and Federman, E. (1979): Nitrate and nitrite reduction in wheat leaves as affected by different types of water stress. *Physiol. Plant* **46**, 318-323.
- Hille, R.** (1996a): Structure and function of mononuclear molybdenum enzymes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1**, 397-404.
- Hille, R.** (1996b): The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* **96**, 2757-2816.
- Hinton, S.M.** & Dean, D. (1990): Biogenesis of molybdenum cofactors. *CRC Rev. Microbiol.* **17**, 169-188.
- Hoff, T.**, Schnorr, K.M., Meyer, C. and Caboche, M. (1995): Isolation of two *Arabidopsis* cDNAs

involved in early steps of molybdenum co-factor biosynthesis by functional complementation of *Escherichia coli* mutants. *J. Biol. Chem.* **270**, 6100-6107.

**Huffaker, R.C.**, Radin, T., Kleinkopf, G.E. and Cox, E.L. (1970): Effects of mild water stress on enzymes of nitrate assimilation and of the carboxylative phase of photosynthesis in barley. *Crop Sci.* **10**, 471-474.

**Ichida, K.**, Matsumura, T., Sakuma, R., Hosoya, T. and Nishino, T. (2001): Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria type II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 1194-1200.

**Johnson, J.L.**, Hainline, B.E. and Rajagopalan, K.V. (1980): Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine oxidase and nitrate reductase. Identification of a pterin as structural component. *J. Biol. Chem.* **255**, 1783-1786.

**Johnson, J.L.** & Rajagopalan, K.V. (1982): Structural and metabolic relationship between the molybdenum cofactor and urothione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6856-6860.

**Johnson, J.L.**, Hainline, B.E., Rajagopalan, K.V. and Arison, B.H. (1984): The pterin component of the molybdenum cofactor. Structural characterization of two fluorescent derivatives. *J. Biol. Chem.* **259**, 5414-5422.

**Johnson, J.L.**, Bastian, N.R. and Rajagopalan, K.V. (1990): Molybdopterin guanine dinucleotide: A modified form of molybdopterin identified in the molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* forma specialis denitrificans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1390-1394.

**Joshi, M.S.**, Johnson, J.L. and Rajagopalan, K.V. (1996): Molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli* *mod* and *mog* mutants. *J. Bacteriol.* **178**, 4310-4312.

**Kaiser, J.T.**, Clausen, T., Bourenkow, G.P., Bartunik, H.-D., Steinbacher, S. and Huber, R. (2000): Crystal structure of a NifS-like protein from *Thermotoga maritima*: Implications for iron sulphur cluster assembly. *J. Mol. Biol.* **297**, 451-464.

**Kamdar, K.P.**, Shelton, M.E. and Finnerty, V. (1994): The *Drosophila* molybdenum cofactor gene *cinnamon* is homologous to three *Escherichia coli* cofactor proteins and to the rat protein Gephyrin. *Genetics* **137**, 791-801.

**Kisker, C.**, Schindelin, H. and Rees, D.C. (1997): Molybdenum cofactor containing enzymes:

Structure and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 233-267.

**Kitamura, S.**, Ohashi, K.N.K., Sugihara, K., Hosokawa, R., Akagawa, Y. and Ohta, S. (2001): Extremely high drug-reductase activity based on aldehyde oxidase in monkey liver. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 856-859.

**Koiwai, H.**, Akaba, S., Seo, M., Komano, T. and Koshihara, T. (2000): Functional expression of two *Arabidopsis* aldehyde oxidases in the yeast *Pichia pastoris*. *J. Biochem.* **127**, 659-664.

**Koshihara, T.**, Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N. and Sato, M. (1996): Purification and properties of flavin- and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize. *Plant Physiol.* **110**, 781-789.

**Koncz, C.**, Chua, N.-H. and Schell, J. (1992): Methods in *Arabidopsis* research. *World Scientific*: Singapore, New Jersey, London, Hong Kong.

**Kramer, S.P.**, Johnson, J.L., Ribeiro, A., Millington, D.S. and Rajagopalan, K.V. (1987): The structure of the molybdenum cofactor. Characterization of di(carboxamidomethyl)molybdopterin from sulfite oxidase and xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **262**, 16357-16363.

**Krenitsky, T.A.**, Tuttle, J.V., Cattau, E.L., Jr. and Wang, P. (1974): A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Comp. Biochem. Physiol.* **49B**, 687-703.

**Laemmli, K.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

**Léon-Kloosterziel, K.M.**, Alvarez Gil, M., Ruijs, G.J., Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A.D. and Koorneef, M. (1996): Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *The Plant Journal* **10** (4), 655-661.

**Leydecker, M.-T.**, Moureaux, T., Kraepiel, Y., Schnorr, K. and Caboche, M. (1995): Molybdenum cofactor mutants, specifically impaired in xanthine dehydrogenase activity and abscisic acid biosynthesis, simultaneously overexpress nitrate reductase. *Plant Physiol.* **107**, 1427-1431.

**Lewis, N.J.**, Hurt, P., Sealy-Lewis, H.M. and Scazzocchio, C. (1978): The genetic control of the molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. A comparison between purine hydroxylase I and II. *Eur. J. Biochem.* **91**, 311-316.

- Logemann, J.**, Schell, J. and Willmitzer, L. (1987): Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry* **163**, 16-20.
- Mahler, H.R.**, Mackler, B. and Green, D.E. (1954): Studies on metallo-flavoproteins.III. Aldehyde oxidase: A molybdo-flavoprotein. *J.Biol. Chem.* **210**, 465-480.
- Maniatis, T.**, Fritsch, T.F. and Sambrook, J. (1982): Molecular cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Marin, E.** & Marion-Poll, A. (1997): Tomato *flacca* mutant is impaired in ABA aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase activities. *Plant Physiol. Biochem.* **35** (5), 369-372.
- Massey, V.** & Edmondson, D. (1970): On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *J. Biol. Chem.* **245**, 6595-6598.
- Mendel, R.R.** (1992): The plant molybdenum cofactor (MoCo) - its biochemical and molecular genetics. *Plant Mol. Biol.* **1**, 11-16.
- Mendel, R.R.** (1997): Molybdenum cofactor of higher plants: Biosynthesis and molecular biology. *Planta* **203**, 399-405.
- Mendel, R.R.** & Schwarz, G. (2002): Biosynthesis and molecular biology of the molybdenum cofactor (Moco). In "Molybdenum and tungsten: Their roles in biological processes", Metal ions in biological systems. Sigel, A. and Sigel, H. (eds); Dekker, M.; Inc., New York, Vol. **39**, im Druck.
- Müller, A.J.** & Mendel, R.R. (1989): Biochemical and somatic cell genetics of nitrate reductase in *Nicotiana*. In: Wray, J.L. and Kinghorn, J.R. (eds). Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation. *Oxford University Press*: 166-185.
- Murashige, T.** & Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Murray, H.G.**, Thompson, W.F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuclear Acid Research* **8**, 4321-4326.
- Nason, A.**, Lee, K.-Y., Pan, S.-S., Ketchum, P.A., Lamberti, A. and De Vries, J. (1971): *In vitro* formation of assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: Nitrate reductase from a *Neurospora* mutant and a component of molybdenum enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 3232-3246.
- Nguyen, J.** (1986): Plant xanthine dehydrogenase: its distribution, properties and function. *Physiol. Vegetale* **24**, 263-281.
- Nicholas, D.J.D.**, Nason, A. and McElroy, W.D. (1954): Molybdenum and nitrate reductase. I. Effects of molybdenum deficiency on the *Neurospora* enzyme. *J. Biol. Chem.* **207**, 341-451.
- Nicholas, D.J.D.** & Nason, A. (1954): Molybdenum and nitrate reductase. II. Molybdenum as a constituent of nitrate reductase. *J. Biol. Chem.* **207**, 353-361.
- Nishino, T.**, Usami, C. and Tsushima, K. (1983): Reversible interconversion between sulfo and desulfo xanthine oxidase in a system containing rhodanese, thiosulfate and sulfhydryl reagent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1826-1829.
- Nieder, J.**, Stallmeyer, B., Brinkmann, H. and Mendel, R.R. (1997): Molybdenum cofactor biosynthesis: Identification of *A. thaliana* cDNAs homologous to the *E. coli* sulfotransferase MoeB. In: Cram, W.J., De Kok, L.J., Stulen, I., Brunold, C. and Rennenberg, H. (eds). Sulphur metabolism in higher plants: Molecular, ecophysiological and nutritional aspects. SPB Academic Publishers, Amsterdam 275-277.
- Palmer, T.**, Vasishita, Whitty, W.P. and Boxer, D. (1994): Isolation of protein FA, a product of the *mob* locus required for molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **222**, 687-692.
- Palmer, T.**, Santini, C.L., Iobbi Nivol, C., Eves, D.J., Boxer, D.H. and Giordano, G. (1996): Involvement of *narJ* and *mob* gene products in distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**, 875-884.
- Parry, A.D.**, Blonstein, A.D., Babiano, M.J., King, P.J. and Horgan, R. (1991): Absciscic acid metabolism in a wilted mutant of *Nicotiana plumbaginifolia*. **183**, 237-243.
- Pateman, J.A.**, Cove, D.J., Rever, B.M. and Roberts, D.B. (1964): A common cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature* **201**, 58-60.
- Peach, C.** & Velten, J. (1991): Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Molecular Biology* **17**, 49-60.

- Pienkos, P.T.**, Shah, V.K. and Brill, W. (1977): Molybdenum cofactors from molybdoenzymes and *in vitro* reconstitution of nitrogenase and nitrate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5468-5471.
- Pitterle, D.M.** & Rajagopalan, K.V. (1993): Biosynthesis of molybpterin in *Escherichia coli*. Purification and characterization of the converting factor. *J. Biol. Chem.* **268**, 13499-13505.
- Pitterle, D.M.**, Johnson, J.L. & Rajagopalan, K.V. (1993): *In vitro* synthesis of molybpterin from precursor Z using purified converting factor. *J. Biol. Chem.* **262**, 13506-13509.
- Rajagopalan, K.V.** & Johnson, J.L. (1992): The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem.* **267**, 10199-10202.
- Rajagopalan, K.V.** (1996): Biosynthesis of the molybdenum cofactor. In: Neidhardt, F. C. (ed). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. ASM Press. Washington DC, 674-679.
- Rech, S.**, Deppenmeier, U. and Gunsalus, R.P. (1995): Regulation of the molybdate transport operon, modABCD, of *Escherichia coli* in response to molybdate availability. *J. Bacteriol.* **177**, 1023-1029.
- Reichert, D.A.** & Westerfeld, W.W. (1953): Isolation and identification of the xanthine oxidase factor as molybdenum. *J. Biol. Chem.* **203**, 915-923.
- Reiter, S.**, Simmonds, H.A., Zollner, N., Braun, S.L. and Knedel, M. (1990): Demonstration of a combined deficiency of xanthine oxidase and aldehyde oxidase in xanthinuric patients not forming oxypurinol. *Clin. Chim. Acta.* **187**, 221-234.
- Rivers, S.L.**, McNairn, E., Blasco, E., Giordano, G. and Boxer, D.H. (1993): Molecular genetic analysis of the *moa* operon of *E. coli* K-12 required for molybdenum cofactor biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **8**, 1071-1081.
- Romao, M.J.**, Archer, M., Moura, J.J.G., LeGall, J., Engh, R., Schneider, M., Hof, P., Huber, R. (1995): Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido reductase from *D. gigans*. *Science* **270**, 1170-1176.
- Rudolph, M.J.**, Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V. and Schindelin, H. (2001): Crystal structure of molybdopterin synthase and its evolutionary relationship to ubiquitin activation. *Nature Struct. Biol.* **8**, 42-46.
- Sagi, M.**, Fluhr, R. and Lips, S.H. (1999): Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in a flacca tomato mutant with deficient abscisic acid and wilt phenotype. *Plant Physiol.* **120**, 571-577.
- Sambrook, J.**, Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanford, J.C.** (1988): The biolistic process. *Tibtech.* **6**, 299-302.
- Scazzocchio, C.** (1973): The genetic control of molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. II. Use of NADH dehydrogenase activity associated with xanthine dehydrogenase to investigate substrate and product inductions. *Mol. Gen. Genet.* **125**, 147-155.
- Scazzocchio, C.**, Holl, F.B. and Fogelman, A.I. (1973): The genetic control of molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. Allopurinol resistant mutants constitutive for xanthine dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **36**, 428-445.
- Scheible, W.R.**, González-Fontes, A., Lauerer, M., Müller-Röber, B., Caboche, M. and Stitt, M. (1995): Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism. *Plant Cell* **9**, 783-798.
- Schindelin, H.**, Kisker, C., Hilton, J., Rajagopalan, K.V. and Rees, D.C. (1996): The overall fold of *Rhodobacter sphaeroides* DMSO reductase is similar to that of FDH. *Science* **272**, 1615-1619.
- Schwartz, S.H.**, Léon-Kloosterziel, K.M., Koorneef, M. and Zeevaart, J.A.D. (1997): Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **114**, 161-166.
- Schwinck, I.** & Chovnick, A. (1960): Eye disc transplantations with garnet pseudoalleles. *Drosophila Information Service* **34**, 105-106.
- Sekimoto, H.**, Seo, M., Kawakami, N., Komano, T., Desloire, S., Liotenberg, S., Marion-Poll, A., Caboche, M., Kamiya, Y. and Koshiba, T. (1998): Molecular cloning and characterization of aldehyde oxidases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **39**, 433-442.
- Seo, M.**, Peeters, A.J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J.A.D., Koorneef, M., Kamiya, Y. and Koshiba, T. (2000a): The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12908-12913.

- Seo, M.**, Koiwai, H., Akaba, S., Komano, T., Oritani, T., Kamiya, Y. and Koshiba, T. (2000b): Absciscic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **23** (4): 482-488.
- Seo, M.** & Koshiba, T. (2002): The complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* **7** (1), 41-48.
- Shah, V.K.** & Brill, W.J. (1977): Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3249-3253.
- Southern, E.M.** (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Stallmeyer, B.**, Nerlich, A., Schiemann, J., Brinkmann, H. and Mendel, R.R. (1995): Molybdenum co-factor biosynthesis: the *Arabidopsis thaliana* cDNA *cnx1* encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein Cinnamon and three *Escherichia coli* proteins. *The Plant Journal* **8** (5): 751-762.
- Stone, T.W.** & Sommonds, H.A. (1991): Purines: Basic and clinical aspects. Kluwer, London.
- Taylor, I.B.** (1991): Genetics of ABA synthesis. In Davies, W.J. and Jones, H.G. (eds). Absciscic acid, physiology and biochemistry. *Bios Publishers*. Oxford: 23-37
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-814.
- Timmermans, M.C.P.**, Maliga, P., Vieira, J. and Messing, J. (1990): The pFF-plasmids: cassettes utilising CaMV sequences for expression of foreign genes in plants. *J. of Biotechnology* **14**, 333-344.
- Tinland, B.** (1996): The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci.* **1**, 178-184.
- Töpfer, R.**, Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J. and Steinbiss, H.H. (1990): A set of plant expression vectors for transcriptional fusions. *Nucl. Acids Res.* **15**, 5890-5895.
- Tomita, S.**, Ichikawa, T. and Ichikawa, Y. (1993): Retinal oxidase is identical to aldehyde oxidase. *FEBS Lett.* **336**, 272-274.
- Valvekens, D.**, van Montagu, M. and van Lisebettens, M. (1988): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5536-5540.
- Vartanian, N.**, Marcotte, L. and Giraudat, J. (1994): Drought rhizogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **104**, 761-767.
- Vision, T.J.**, Brown, D.G. and Tanksley, S.D. (2000): The origins of genomic duplication in *Arabidopsis*. *Science* **290**, 2114-2117.
- Walker-Simmons, M.**, Kudrna, D.A. and Warner, R.L. (1989): Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley. *Plant Physiol.* **90**, 728-733.
- Wahl, R.C.**, Warner, C.K., Finnerty, V. and Rajagopalan, K.V. (1982): *Drosophila melanogaster* *ma-l* mutants are defective in the sulfuration of desulfo Mo hydroxylases. *J. Biol. Chem.* **257** (7), 3958-3962.
- Wahl, R.C.** & Rajagopalan, K.V. (1982): Evidence for the inorganic nature of the cyanolyzable sulfur of molybdenum hydroxylases. *J. Biol. Chem.* **257** (3), 1354-1359.
- Warner, C.K.** & Finnerty, V. (1981): Molybdenum hydroxylases in *Drosophila*. II. Molybdenum cofactor in xanthine dehydrogenase, aldehyde oxidase and pyridoxal oxidase. *Mol. Gen. Genet.* **184**, 92-96.
- Watanabe, T.**, Ihara, N., Itoh, T., Fujita, T. and Sugimoto, Y. (2000): Deletion mutation in *Drosophila* *ma-l* homologous, putative molybdopterin cofactor sulfurase gene is associated with bovine xanthinuria type II. *J. Biol. Chem.* **275** (29), 21789-21792.
- Witte, C.P.**, Igeño, M.I., Mendel, R.R., Schwarz, G. and Fernández, E. (1998): The *Chlamydomonas reinhardtii* Moco carrier protein is multimeric and stabilizes molybdopterin cofactor in a molybdate charged form. *FEBS Letters* **431**, 205-209.
- Wootton, J.C.**, Nicolson, R.E., Walters, D.E., Burke, J.F., Doyle, W.A. and Bray, R.C. (1991): Enzymes depending on the pterin molybdenum cofactor: Sequence families, spectroscopic properties of molybdenum and possible cofactor binding domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1057**, 157-185.
- Wuebbens, M.M.** & Rajagopalan, K.V. (1995): Investigation of the early steps of molybdenum biosynthesis in *Escherichia coli* through the use of *in vivo* labeling studies. *J. Biol. Chem.* **270**, 1082-1087.
- Xiong, L.**, Ishitani, M., Lee, H. and Zhu, J.K. (2001): *The Arabidopsis los5/aba3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold

stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* **13**, 2063-2083.

**Zeevaart, J.A.D.** (1999): Absciscic acid metabolism and its regulation. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*; Elsevier Science B.V.; Hooykaas, P.J.J., Hall, M.A. and Libbenga, K.R. (eds), 189-207.

**Zheng, L.**, White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F. and Dean, D.R. (1993): Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2754-2758.

**Zheng, L.** & Dean, D.R. (1994): Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster. *J. Biol. Chem.* **269** (29), 18723-18726.

**Zheng, L.**, White, R.H., Cash, V.L. and Dean, D.R. (1994): Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the *nifS* gene product. *Biochem.* **33**, 4714-4720-

# Anhang

## I. Nukleotidsequenzen

### I.1. *A. thaliana aba3*-cDNA (GenBank Accession: AF325457)

Length of *aba3*-cDNA+ncds: 2630 bp; Listed from: 3 to: 2630;  
Translated from: 51 to: 2507 (Entire region);

```

Frame 3
ATT TTT CAG AGA TTA CCA GAG AGA CAG CGA GAA ACA TTT CTT TCG M E A F
      11      20      29      38      47      56      65      74
L   K   E   F   G   D   Y   Y   G   Y   P   D   G   P   K   N   I   Q   E   I   R   D
CTT AAG GAA TTC GGA GAT TAT TAT GGA TAC CCA GAT GGT CCC AAG AAC ATT CAA GAG ATC CGC GAC
      71      80      89      98     107     116     125     134
T   E   F   K   R   L   D   K   G   V   V   Y   L   D   H   A   G   S   T   L   Y   S
ACC GAA TTC AAG AGA TTA GAT AAA GGT GTT GTA TAC TTG GAT CAT GCT GGT TCT ACT TTG TAT TCT
      137     146     155     164     173     182     191     200
E   L   Q   M   E   Y   I   F   K   D   F   T   S   N   V   F   G   N   P   H   S   Q
GAG TTG CAG ATG GAA TAT ATT TTT AAG GAC TTC ACA AGC AAT GTT TTT GGA AAT CCA CAT AGT CAA
      203     212     221     230     239     248     257     266
S   D   I   S   S   A   T   S   D   L   I   A   D   A   R   H   Q   V   L   E   Y   F
AGT GAT ATC AGT TCG GCC ACC AGT GAC CTT ATA GCG GAT GCT CGA CAT CAG GTG CTT GAA TAC TTT
      269     278     287     296     305     314     323     332
N   A   S   P   E   D   Y   S   C   L   F   T   S   G   A   T   A   L   K   V
AAT GCA TCT CCT GAA GAT TAC AGT TGC TTA TTC ACC TCC GGA GCC ACA GCA ACG CTG AAG CTT GTC
      335     344     353     362     371     380     389     398
G   E   T   F   P   W   T   Q   D   S   N   F   L   Y   T   M   E   N   H   N   S   V
GGA GAG ACT TTT CCG TGG ACC CAA GAC AGT AAT TTT TTG TAT ACC ATG GAG AAT CAC AAC AGT GTA
      401     410     419     428     437     446     455     464
L   G   I   R   E   Y   A   L   A   Q   G   A   S   A   C   A   V   D   I   E   E   A
CTT GGT ATT AGG GAA TAT GCA TTA GCT CAA GGT GCT TCA GCA TGT GCA GTG GAT ATT GAA GAG GCA
      467     476     485     494     503     512     521     530
A   N   Q   P   G   Q   L   T   N   S   G   P   S   I   K   V   K   R   A   V   Q
GCT AAC CAA CCA GGC CAG CTT ACA AAT TCA GGA CCA TCT ATC AAG GTA AAG CAT CGT GCT GTG CAG
      533     542     551     560     569     578     587     596
M   R   N   T   S   K   L   Q   K   E   E   S   R   G   N   A   Y   N   L   F   A   F
ATG AGA AAC ACT TCT AAA CTC CAA AAG GAA GAG TCA AGA GGA AAT GCC TAT AAT CTA TTT GCT TTC
      599     608     617     626     635     644     653     662
P   S   E   C   N   F   S   G   L   R   F   N   L   D   L   V   K   L   M   K   E   N
CCC TCG GAG TGC AAT TTT TCT GGC CTG AGG TTT AAT CTA GAT CTG GTG AAG TTG ATG AAA GAA AAT
      665     674     683     692     701     710     719     728
T   E   T   V   L   G   S   P   F   S   K   R   W   M   V   L   I   D   A
ACT GAG ACC GTG CTA CAA GGC TCC CCC TTT AGC K   AAG AGC AAG CGG TGG ATG V   GTC TTG ATT GAT GCT
      731     740     749     758     767     776     785     794
A   K   G   C   A   T   L   P   P   D   L   S   E   Y   P   A   D   F   V   V   L   S
GCA AAG GGT TGT GCT ACA CTA CCA CCT GAT TTA TCG GAG TAT CCT GCA GAT TTT GTT GTT CTG TCA
      797     806     815     824     833     842     851     860
F   Y   K   L   F   G   Y   P   T   G   L   G   A   L   L   V   R   N   D   A   A   K
TTC TAC AAG TTA TTT GGT TAT CCT ACT GGG CTT GGC GCT CTC CTT GTA CGG AAT GAT GCA GCC AAA
      863     872     881     890     900     909     918     927
L   L   K   K   T   Y   F   S   G   T   G   A   A   S   I   A   D   I   D   V
TTG CTC AAA AAG ACT TAT TTT AGT GGA GGC ACT GTT GCT GCT TCA ATT GCT GAC ATC GAC TTT GTA
      929     938     947     956     965     974     983     992
K   R   R   E   R   V   E   E   F   F   E   D   G   S   A   S   F   L   S   I   A   A
AAA AGA AGG GAA AGG GTG GAG GAG TTT TTT GAG GAT GGT TCT GCT TCA TTC TCA AGC ATA GCA GCC
      995     1004     1013     1022     1031     1040     1049     1058
I   R   H   G   F   K   L   L   K   S   L   T   P   S   A   I   W   M   H   T   T   S
ATC CGT CAT GGC TTC AAA TTA CTC AAG TCG CTT ACA CCT TCT GCA ATT TGG ATG CAC ACA ACG TCA
      1061     1070     1079     1088     1097     1106     1115     1124
L   S   I   Y   V   K   K   K   L   Q   A   L   R   H   G   N   G   A   V   C   V
CTT TCC ATA TAT GTG AAA AAG AAG CTT CAG GCT TTA CGA CAT GGA AAC GGG GCT GCT GTA TGT GTT
      1127     1136     1145     1154     1163     1172     1181     1190
L   Y   G   S   E   N   L   E   L   S   S   H   K   S   G   P   T   V   T   F   N   L
CTG TAT GGC AGT GAA AAT CTG GAG TTA TCT TCA CAT AAA TCA GGC CCA ACG GTT ACA TTC AAC TTG
      1193     1202     1211     1220     1229     1238     1247

```



K R P D G S W F G Y L E V E K L A S L S G I  
AAA AGA CCT GAT GGC TCT TGG TTT GGC TAC TTG GAG GTG GAG AAG CTT GCT TCT TTA TCT GGA ATT  
1259 1268 1277 1286 1295 1304 1313

Q L R T G C F C N P G A C A K Y L E L S H S  
CAG TTA CGG ACA GGA TTT TGC AAT CCT GGC GCA TGT GCA AAG TAT CTC GAG TTA TCC CAT TCT  
1325 1334 1343 1352 1361 1370 1379

E L R S N V E A G H I C W D D N D V I N G K  
GAG CTA CGG TCT AAT GTA GAG GCT GGG CAT ATT TGC TGG GAT GAC AAT GAT GTG ATA AAT GGA AAA  
1391 1400 1409 1418 1427 1436 1445

P T G A V R V S F G Y M S T F E D A K K F I  
CCA ACA GGG GCT GTT AGG GTT TCG TTT GGT TAT ATG TCA ACC TTT GAA GAT GCC AAG AAA TTT ATT  
1457 1466 1475 1484 1493 1502 1511

D F I I S S F A S P P K K T G N G T V V S G  
GAT TTC ATC ATA AGT TTT TTT GCT TCA CCT CCA AAG ACT GGG AAT GGA ACC VTC GTC AGT GGA  
1523 1532 1541 1550 1559 1568 1577

R F P Q L P S E D L E S K E S F P S H Y L K  
AGG TTT CCT CAA CTT CCT AGT GAA GAC CTT GAA AGT AAA GAA TCT TTT CCA AGC CAC TAC CTT AAG  
1589 1598 1607 1616 1625 1634 1643

S I T V Y P I K S C A G F S V I R W P L C R  
TCA ATT ACT GTA TAC CCG ATC AAG TCA TGT GCT GGA TTT TCT GTG ATA CGT TGG CCA CTT TGC AGA  
1655 1664 1673 1682 1691 1700 1709

T G L L H D R E W M V Q G L T G E I L T Q K  
ACA GGC CTG CAT GAT CGA GAA TGG ATG GTT CAG GGT CTG ACC GGT GAA ATT CTT ACC CAA AAG  
1721 1730 1739 1748 1757 1766 1775

K V P E M S L I K T F I D L E E G L L S V E  
AAG GTG CCT GAG ATG TCT CTT ATA AAA ACC TTT ATC GAC CTT GAG GAA GGA CTA CTG TCT GTA GAA  
1787 1796 1805 1814 1823 1832 1841

S S R C E D K L H I R I K S D S Y N P R N D  
TCT TCT CGC TGC GAA GAC AAG TTG CAC ATC AGA ATC AAG TCT GAT TCA TAT AAC CCG AGG AAC GAT  
1853 1862 1871 1880 1889 1898 1907

E F D S H A N I L E N R N E E T R I N R W F  
GAG TTT GAT TCA CAT GCC AAC ATA CTT GAA AAC CGT AAT GAG GAA ACT AGA ATC AAT CGT TGG TTC  
1919 1928 1937 1946 1955 1964 1973

T N A I G R Q C K L L R Y S S S T S K D C L  
ACC AAT GCC ATT GGT CGA CAA TGC AAG TTG CTA CGG TAT TCT AGC TCT ACT TCC AAA GAC TGC TTG  
1985 1994 2003 2012 2021 2030 2039

N R N K S P G L C R D L E S N I N F A N E A  
AAC AGA AAC AAG AGT CCT GGT TTG TGC AGA GAT TTG GAA AGC AAT ATC AAC TTT GCT AAT GAA GCT  
2051 2060 2069 2078 2087 2096 2105

Q F L L I S E E S V A D L N R R L E A K D E  
CAG TTC TTG TTA ATC TCC GAG GAG AGT GTT GCT GAC CTA AAC AGA AGA TTA GAA GCA AAA GAC GAG  
2117 2126 2135 2144 2153 2162 2171

D Y K R A H E K L N P H R F R P N L V I S G  
GAT TAC AAA CGG GCT CAT GAA AAA CTC AAT CCA CAT AGG TTC AGA CCA AAT CTG GTT ATA TCT GGA  
2183 2192 2201 2210 2219 2228 2237

G E P Y G E D K W K T V K I G D N H F T S L  
GGT GAA CCA TAC GGG GAA GAT AAA TGG AAA ACT GTC AAG ATA GGA GAC AAT CAT TTC ACA TCA TTG  
2249 2258 2267 2276 2285 2294 2303

G G C N R C Q M I N I S N E A G L V K K S N  
GGC GGT TGT AAC CGG TGC CAG ATG ATA AAC ATA AGT AAT GAA GCT GGA CTA GTG AAG AAA TCC AAT  
2315 2324 2333 2342 2351 2360 2369

E P L T T L A S Y R R V K G K I L F G T L L  
GAG CCC TTA ACA ACT TTA GCT TCA TAT AGG AGA GTA AAG GGA AAG ATC TTG TTT GGA ACG CTT TTG  
2381 2390 2399 2408 2417 2426 2435

R Y E I D E K R Q C W I G V G E E V N P D I  
AGA TAC GAG ATT GAT GAG AAA AGA CAA TGT TGG ATT GGA GTT GGG GAA GAA GTT AAT CCA GAT ATT  
2447 2456 2465 2474 2483 2492 2501

E  
GAA TAA GTT CAA GCT TGT GTG TAT TAT CGT CTA CTA TAC ATA AAA ATA AAC ATA TGG AGA AGC ATC  
2513 2522 2531 2540 2549 2558 2567

AAA AGT ATA AAC ATA TGG AGA AGC GTC AAA AGC ATA TGA GAA CAA ATC TGT TAC TGG ACC  
2579 2588 2597 2606 2615 2624

I.2. *A. thaliana* Cytochrom P450-Monooxygenase (auf BAC-Klon F20D23/AC007651)

Length of Cyt.p450.consensus: 1787 bp; Listed from: 2 to: 1787;  
Translated from: 143 to: 1699 (Entire region);

Frame 2

	TAG	TGA	TTA	GAT	ATC	CAG	CTG	CCT	CCA	ACA	TAT	ATA	GTC	AAC	TGA	TGA	AAT	TAT	AAG	CAT	
			10			19			28			37			46			55			
CAT	CAT	TAT	AGT	TTT	GTC	TCC	TTT	TTT	TCT	TCT	TCT	TTT	CTT	TTT	CTT	TCT	AGC	TAC	TCT	CTT	CTT
		70			79			88			97			106			115			124	
CAT	AGC	TAG	ATC	AAG	ATG	TTA	GAG	ATC	ATT	ACG	GTA	AGA	AAA	GTG	TTC	TTG	ATC	GGA	TTC	TTG	ATC
		136			145			154			163			172			181			190	
L	I	L	N	W	V	W	R	A	V	N	W	V	W	L	R	P	K	R	L	E	K
TTG	ATA	CTG	AAT	TGG	GTA	TGG	AGA	GCT	GTG	AAT	TGG	GTT	TGG	TTA	AGG	CCA	AAG	AGA	CTG	E	AAA
		202			211			220			229			238			247			256	
Y	L	K	K	Q	G	F	S	G	N	S	Y	R	I	L	M	G	D	M	R	E	S
TAT	CTG	AAG	AAA	CAA	GGA	TTC	TCT	GGG	AAT	TCT	TAT	AGA	ATT	TTA	ATG	GGA	GAT	ATG	AGA	GAG	AGT
		268			277			286			295			304			313			322	
N	Q	M	D	Q	V	A	H	S	L	P	L	P	L	D	A	D	F	L	P	R	M
AAT	CAG	ATG	GAT	CAA	GTT	GCT	CAC	TCT	CTT	CCT	CTT	CCT	CTC	GAC	GCC	GAT	TTT	CTC	CCT	CGC	ATG
		334			343			352			361			370			379			388	
M	P	F	L	H	H	T	V	L	K	H	K	K	K	C	F	T	W	Y	G	P	Y
ATG	CCT	TTT	CTC	CAC	CAC	ACT	GTT	CTA	AAA	CAT	GGG	AAG	AAG	TGT	TTC	ACA	TGG	TAC	GGA	CCG	TAC
		400			409			418			427			436			445			454	
P	N	V	I	V	M	D	P	E	T	L	R	E	I	M	S	K	H	E	L	F	P
CCG	AAC	GTG	ATA	GTA	ATG	GAT	CCA	GAG	ACA	CTC	CGA	GAG	ATT	ATG	TCA	AAA	CAC	GAA	CTC	TTT	CCA
		466			475			484			493			502			511			520	
K	P	K	I	G	S	H	N	H	V	F	L	S	G	L	L	N	H	E	G	P	K
AAA	CCA	AAG	ATC	GGG	TCA	CAT	AAT	CAT	GTT	TTC	CTA	AGT	GGT	CTT	CTC	AAT	CAC	GAA	GGT	CCT	AAA
		532			541			550			559			568			577			586	
W	S	K	H	R	S	I	L	N	P	A	F	R	I	D	N	L	K	S	I	L	P
TGG	TCC	AAG	CAT	CGA	AGC	ATT	CTT	AAT	CCT	GCT	TTT	CGT	ATC	GAT	AAT	TTG	AAG	AGC	ATA	CTA	CCA
		598			607			616			625			634			643			652	
A	F	N	S	S	C	K	E	M	L	E	E	W	E	R	L	A	S	A	K	G	T
GCA	TTT	AAC	TCG	AGT	TGC	AAA	GAA	ATG	TTA	GAA	GAA	TGG	GAG	AGA	TTA	GCC	TCA	GCA	AAA	GGA	ACA
		664			673			682			691			700			709			718	
M	E	L	D	S	W	T	H	C	H	D	L	T	R	N	M	L	A	R	A	S	F
ATG	GAA	CTT	GAT	TCA	TGG	ACT	CAC	TGT	CAT	GAC	TTA	ACC	AGA	AAC	ATG	CTT	GCT	CGT	GCT	TCT	TTT
		730			739			748			757			766			775			784	
G	D	S	Y	K	D	G	I	K	I	F	E	I	Q	Q	E	Q	I	D	L	G	L
GGT	GAT	TCC	TAC	AAA	GAT	GGT	ATC	AAG	ATC	TTC	E	ATC	CAA	CAA	GAA	CAG	ATT	GAT	CTT	GGT	CTC
		796			805			814			823			832			841			850	
L	A	I	R	A	V	Y	I	S	G	S	K	F	L	P	T	K	F	N	R	R	L
CTT	GCT	ATT	CGA	GCC	GTC	TAC	ATT	TCT	GGC	TCA	AAG	TTT	TTG	CCA	ACA	AAG	TTC	AAC	AGG	AGG	TTG
		862			871			880			889			898			907			916	
R	E	T	E	R	D	M	R	A	M	F	K	A	M	I	E	T	K	E	E	E	I
AGA	GAA	ACC	GAA	AGG	GAC	ATG	AGG	GCT	ATG	TTT	AAA	GCG	ATG	ATT	GAG	ACA	AAA	GAG	GAG	GAG	ATA
		928			937			946			955			964			973			982	
E	R	G	R	G	T	D	K	N	S	D	L	L	F	S	M	L	A	S	N	T	K
GAA	AGA	GGA	AGA	GGT	ACC	GAC	AAA	AAC	AGC	GAC	TTG	TTG	TTC	TCG	ATG	TTG	GCT	TCG	AAT	ACA	AAA
		994			1003			1012			1021			1030			1039			1048	
T	I	K	E	Q	G	P	D	S	G	L	S	L	D	D	L	I	D	D	C	K	A
ACC	ATC	AAA	GAA	CAA	GGA	CCA	GAT	TCA	GGG	CTG	AGT	CTT	GAT	GAT	CTG	ATA	GAT	GAC	TGC	AAG	GCT
		1060			1069			1078			1087			1096			1105			1114	
F	Y	L	A	G	Q	N	V	T	S	S	L	F	V	W	T	L	V	A	L	S	Q
TTC	TAT	CTA	GCT	GGT	CAA	AAT	GTG	ACT	TCT	TCA	TTG	TTT	GTT	TGG	ACA	CTT	GTT	GCT	CTA	AGC	CAA
		1126			1135			1144			1153			1162			1171			1180	
H	Q	D	W	Q	N	K	A	R	D	E	I	S	Q	A	F	G	N	N	E	P	D
CAT	CAA	GAT	TGG	CAA	AAC	AAA	GCA	AGA	GAC	GAG	ATT	TCT	CAG	GCC	TTC	GGT	AAC	AAC	GAA	CCC	GAT
		1192			1201			1210			1219			1228			1237			1246	
F	E	G	L	S	H	L	K	V	V	T	M	I	L	H	E	V	L	R	L	Y	S
TTC	GAA	GGG	CTA	AGC	CAC	CTG	AAA	GTC	GTA	ACA	ATG	ATC	CTC	CAT	GAA	GTT	CTA	CGA	CTC	TAT	TCA
		1258			1267			1276			1285			1294			1303			1312	
P	A	Y	F	T	C	R	I	T	K	Q	E	V	K	L	E	R	F	S	L	P	E
CCA	GCT	TAC	TTC	ACA	TGT	CGG	ATA	ACT	AAA	CAA	GAA	GTG	AAG	CTA	GAG	AGA	TTC	TCT	TTA	CCT	GAA
		1324			1333			1342			1351			1360			1369			1378	
G	V	V	T	I	P	M	L	L	V	H	CAT	D	S	D	L	W	G	D	D	V	
GGA	GTT	GTA	GTA	ACA	ATA	CCA	ATG	CTC	TTG	GTG	CAC	HAT	GAT	TCT	GAT	CTT	TGG	GGA	GAC	DAT	GTG
		1390			1399			1408			1417			1426			1435			1444	

```

K   E   F   K   P   E   R   F   A   N   G   V   A   G   A   T   K   G   R   L   S   F
AAA GAG TTT AAG CCC GAG AGA TTC GCC AAT GGC GTG ACG GGT GCA ACC AAA GGA AGA CTC TCC TTC
      1456           1465           1474           1483           1492           1501           1510

L   P   F   S   S   G   P   R   T   C   I   G   Q   N   F   S   M   L   Q   A   K   L
TTG CCA TTT AGC TCG GGC CCT CGG ACT TGT ATC GGT CAG AAC TTT TCG ATG TTG CAA GCT AAA CTC
      1522           1531           1540           1549           1558           1567           1576

F   L   A   M   V   L   Q   R   F   S   V   E   L   S   P   S   Y   T   H   A   P   F
TTC TTG GCA ATG GTA CTT CAA AGG TTC AGT GTT GAA CTC TCT CCA TCG TAT ACT CAT GCT CCT TTC
      1588           1597           1606           1615           1624           1633           1642

P   A   A   T   T   F   P   Q   H   G   A   L   I   I   R   K   L
CCA GCT GCA ACT ACA TTT CCA CAA CAT GGA GCT CAT TTG ATC ATC CGA AAA CTG TAG GAG GTA GAA
      1654           1663           1672           1681           1690           1699           1708

GAA TGA GGA AAA AAA TGT AAA GGT GCT TCC TTT TTT TTT GTT CAT CAA CAA AAC AGA ACC TTG AAG
      1720           1729           1738           1747           1756           1765           1774

GTG TGT AGA A
      1786

```

### I.3. Linke Grenze der T-DNA mit flankierendem Bereich aus dem Cytochrom P450-homologen Gen (auf BAC-Klon F20D23/AC007651)

Length of IPCR-EcoRI/II: 1441 bp

```

Frame 1 -EcoRI-
GAA TTC TTA TAG AAT TTT AAT GGG AGA TAT GAG AGA GAG TAA TCA GAT GGA TCA AGT TGC
      9           18           27           36           45           54

TCA CTC TCT TCC TCT TCC TCT CGA CGC CGA TTT TCT CCC TCG CAT GAT GCC TTT TCT CCA CCA CAC
      69           78           87           96          105          114          123

TGT TCT AAA ACA TGG TAT GAT CCC ATC AAC CTC AAC TTA AAT TGT ATA TCA ATT GTT TTA ATT ATG
      135          144          153          162          171          180          189

GGG TTA TTT AAT TAC TTG AAA GAA ATG TGA ATC TAT ATA AGA ACC AAT TAT ATA TAC TTG ACA TAT
      201          210          219          228          237          246          255

CTT GGG TTA GAT TCA TAA CGA TTA TTT ATA ATT TTG ACT AGG AGT AGG TCA TCT TCT TCC ATC ATG
      267          276          285          294          303          312          321

ACT TTT TTT TTT TTT TAT CAT TTT CAA AAA GTA TAA TAT ATG AAC AGA GAA ATT CAG AGT TAA GAA
      333          342          351          360          369          378          387

ATA AAA GGA GTT TAA TGT GTA TAC AGA TTA TAG AAT GAT ACA CAT TTT CAT AAT TAA GAT CTA AAT
      399          408          417          426          435          444          453

CTG ATA CCC TTT GTT TCC CTG GTT TTG TCT AAA TCT AGT TCA ATA TAC ATA TGA TTG TTG TAT GTG
      465          474          483          492          501          510          519

CTT TGT TTT GTT TCA TTT GTG AAT TTG GTA ATT TAA AAG TAA CAA ATG GTA ATA ATT AAT GAA TAT
      531          540          549          558          567          576          585

ATG TTT GAA TAG GGA AGA AGT GTT TCA CAT GGT ACG GAC CGT ACC CGA ACG TGA TAG TAA TGG ATC
      597          606          615          624          633          642          651

CAG AGA CAC TCC GAG AGA TTA TGT CAA AAC ACG AAC TCT TTC CAA AAC CAA AGA TCG GGT CAC ATA
      663          672          681          690          699          708          717

ATC ATG TTT TCC TAA GTG GTC TTC TCA ATC ACG AAG GTC CTA AAT GGT CCA AGC ATC GAA GCA TTC
      729          738          747          756          765          774          783

TTA ATC CTG CTT TTC GTA TTG ATA ATT TGA AGG TAT GTT TTT CTT TTA CCA AAA AAG AAG AAG AGA
      795          804          813          822          831          840          849

ATA TAT AGA ATG CTC ATT TTG ACT CTA ATA ATT ATA TTT TGT TTT TTT TAT AAT TGA TTT TTA ACT
      861          870          879          888          897          906          915

CTG ACA TAA TGT GAA CTT TGT GGA CGT CAT TTT CGT CTC ATT CTT TAG ATT TTG GTC AGT TTC ATT
      927          936          945          954          963          972          981

```

CTC TCT TTA CTT TTT TTC GAA AAA AGT CAG ATA AAG TAA CGT CTT TCC TCT TGT TTC TTA GCT CAG  
993 1002 1011 1020 1029 1038 1047

AGA TTT AAA CAA TAA TTA TAT TAA AAA AAA AAT CAT GTA TTA ACT ATT TAA AAA AAA TAA AAA AAT  
1059 1068 1077 1086 1095 1104 1113

CAA GAT ATA ACA GAA AAG AAA AAA AAA ATC TCT TAA ACA AAA AAA TAT TAA ATA TCC CGG AAA GAA  
1125 1134 1143 1152 1161 1170 1179

CAT AAA GAA ATA CCT AAA AAA GGT ATT TAT AGA AAA AGA AGA AAC GGA GAA AAA AAA AAG TCA GCA  
1191 1200 1209 1218 1227 1236 1245

AAG AAC TAA AGA ATC CAC GCC ACG CCA CCA AGT CAC CCA ACT TAA AAG TCT AAA AGC AAA AAA AAC  
1257 1266 1275 1284 1293 1302 1311

AGA AAA AGC CAA AAA GGC ACA TTA CAA GAA GGT GAA AAT GAA ATC ATC ATA TTT CAA CTC AAG AAT  
1323 1332 1341 1350 1359 1368 1377

**Integrationsort der linken Grenze der T-DNA**  
**← Cytochrom P450/F20D23 ↓ T-DNA →**

TTC TAA AAT ACC AAA TTT ATT TCG ACA AAA AGA ATT TAT CAT TTC ATT ATC AGT GTA GAA A↓T TAT  
1389 1398 1407 1416 1425 1434

TAC TTC AGG ATA TAT GCC AAC GTA AAA ATG AGG GCA ATC GAT TGT ACT GAA TCG GAT TTT CAA GGG  
13 22 31 40 49 58 67

TCT GGC CAA AAG AAT TC. ... .. pGKB5  
79 -EcoRI--

## Zusammenfassung

Der Molybdän-Cofaktor (Moco) ist mit Ausnahme der Nitrogenase ein essentieller Bestandteil aller Molybdoenzyme. Während jedoch die eukaryontischen Molybdoenzyme der Sulfitoxidase-Klasse für ihre Aktivität zwei Sauerstoff-Atome am Molybdän des Mocos benötigen, muß für die Aktivierung der Enzyme der Xanthinoxidase-Klasse einer der Sauerstoffe durch einen Schwefel ersetzt werden. Frühere Analysen von Mutanten aus *Arabidopsis thaliana* haben gezeigt, daß der *aba3*-Locus an diesem letzten Schritt der posttranslationalen Modifikation des Mocos von Aldehydoxidasen (AO) und Xanthindehydrogenase beteiligt ist.

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Isolierung einer vollständigen *aba3*-cDNA sowie die biochemische Charakterisierung des rekombinanten Proteins. ABA3 ist ein dimeres Protein mit einer N-terminalen NifS-ähnlichen Cystein-Desulfurase-Domäne und einer C-terminalen Domäne, die an der Erkennung von AO und XDH beteiligt sein könnte. Darüber hinaus besitzt die C-terminale Domäne DNA-Bindungs-Signaturen und ein Kernlokalisierungs-Signal, wodurch eine Funktion als Transkriptionsfaktor im Kern angedeutet wird. Die biochemische Analyse des rekombinant überexprimierten ABA3-Proteins erbrachte den funktionellen Nachweis zweier Aktivitäten: (i) L-Cystein kann durch die Cystein-Desulfurase-Aktivität von ABA3 als Schwefel-Donor genutzt werden und (ii) der als Persulfid gebundene Schwefel wird durch die Moco-Sulfurierungs-Aktivität von ABA3 direkt auf den Moco einer rekombinanten Aldehydoxidase aus *Arabidopsis* übertragen. Hierdurch wurde gezeigt, daß die gesamte Schwefel-Übertragungsreaktion nach einem ähnlichen Mechanismus abläuft wie bei bakteriellen NifS-Proteinen.

Durch die molekulare Analyse dreier *aba3*-Mutanten wurden verschiedene Mutationen in beiden Domänen gefunden, die sich physiologisch mit unterschiedlicher Stärke im Phänotyp manifestieren. Da im Wesentlichen das Phytohormon Abscisinsäure die jeweiligen Phänotypen bestimmt und an dessen Synthese eine bzw. mehrere AOs beteiligt sind, konnte ein direkter Zusammenhang zwischen ABA3 und der Abscisinsäure-Synthese hergestellt werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß die Expression von ABA3 durch Trockenstreß induzierbar ist und eine stark erhöhte Aktivität vor allem der putativen Abscisinaldehyd-spezifischen AO nach sich zieht. Diese Beobachtungen legen nahe, daß ABA3 *in vivo* den letzten Schritt der Abscisinsäure-Synthese, die Oxidation von Abscisinaldehyd durch eine AO, reguliert und damit maßgeblich die gesamte Abscisinsäure-Synthese kontrolliert.

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf-R. Mendel, dessen Unterstützung ich zu jeder Zeit gewiß sein konnte. Sein Engagement und sein Vertrauen in diese Arbeit haben entscheidend dazu beigetragen, meine Begeisterung für die Forschung stets zu erhalten. Für die Möglichkeit, wissenschaftliche Tagungen zu besuchen, danke ich ihm ebenso wie für den Freiraum, eigene Ideen selbständig verwirklichen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Cerff danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die freundliche Bereitschaft, das Zweitgutachten dieser Dissertation zu verfassen.

Danken möchte ich an dieser Stelle auch Frau Prof. Dr. Victoria Finnerty von der Emory-University in Atlanta, Georgia/USA für die Erlaubnis, die Peptidsequenzen von Maroon-like aus *Drosophila* und HxB aus *Aspergillus* vor deren Veröffentlichung nutzen zu dürfen. Frau Dr. Annie Marion-Poll vom „Institut National de la Recherche Agronomique“ (INRA) in Versailles/Frankreich danke ich für die Bereitstellung der *Arabidopsis*-Mutanten und Herrn Prof. Dr. Tomokazu Koshiba von der Metropolitan-Universität in Tokio/Japan für das unkomplizierte Überlassen des die Aldehydoxidase AAO1-überexprimierenden *Pichia Pastoris*-Stammes.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich richten an Ute Nieländer und Mandy Bretthauer, deren helfende Hände ich zu jeder Zeit sehr gern in Anspruch nahm sowie an Mislav Oreb, dessen von mir betreute Diplomarbeit trotz mancher Widrigkeiten von ihm in hervorragender Weise durchgeführt wurde.

Bei Dr. Robert Hänsch und Dr. Günter Schwarz möchte ich mich für die Unterstützung in allen Pflanzen-Fragen bzw. für die biochemische Hilfe und die vielen hilfreichen Anregungen bedanken. Allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mendel danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit und das sehr angenehme Arbeitsklima.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meiner Lebensgefährtin, meiner Familie und meinen Freunden für all die Unterstützung, Ablenkung und Aufheiterung bedanken, die mir in den vergangenen Jahren zukam.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Florian Bittner  
Geburtsdatum: 22. Januar 1970  
Geburtsort: Wolfsburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

## Schulausbildung:

Aug. 1976 - Juli 1980 Grundschule Alt-Wolfsburg  
Aug. 1980 - Juni 1982 Orientierungsstufe Kreuzheide, Wolfsburg  
Juli 1982 - Mai 1989 Gymnasium Kreuzheide, Wolfsburg

## Grundwehrdienst und Praktikum:

Okt. 1989 - Sept. 1990 Grundwehrdienst, 3. Panzerartillerie Bataillon 25, Braunschweig  
Okt. 1990 - Sept. 1991 Praktikum im Garten- und Landschaftsbau, Wolfsburg

## Studium:

Okt. 1991 - Okt. 1993 Grundstudium der Biologie an der TU-Braunschweig  
Vordiplom im Oktober 1992  
Nov. 1993 - Okt. 1997 Hauptstudium der Biologie an der TU-Braunschweig  
Diplomprüfungen zwischen 11/1995 und 01/1996  
Feb. 1996 - Okt. 1997 Diplomarbeit am Botanischen Institut der TU-Braunschweig mit dem  
Thema: „Molekulare Charakterisierung der *chl6*-Mutante von  
*Arabidopsis thaliana* und funktionelle Komplementation dieser Mutante  
mit den Genen *cnx1* aus *Arabidopsis thaliana* und *gephyrin* aus *Rattus  
norvegicus*“  
Nov. 1997 Abschluß zum Diplom-Biologen

## Berufliche Tätigkeit:

seit März 1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Botanischen Institut der TU-  
Braunschweig und Promotion mit dem Thema „Posttranslationale  
Modifikation von Aldehydoxidasen und Xanthindehydrogenase:  
Isolierung und Charakterisierung der Molybdän-Cofaktor-Sulfurase  
ABA3 aus *Arabidopsis thaliana*“

## Allgemeine Publikationen:

Schwarz, G., Schulze, J., Bittner, F., Eilers, T., Kuper, J., Bollmann, G.,  
Nerlich, A., Brinkmann, H., and Mendel, R.R. (2000): The Molybdenum  
Cofactor Biosynthetic Protein Cnx1 Complements Molybdate-Repairable  
Mutants, Transfers Molybdenum to the Metal Binding Pterin and Is  
Associated with the Cytoskeleton. *Plant Cell* **12**, 2455-2472.